

# **Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf**

Sektion Biochemie

Leiter: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Braulke

Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin

Direktorin: Prof. Dr. med. Ania C. Muntau

## **Glutarylierung mitochondrialer Proteine als neuer regulatorischer Pathomechanismus der Glutarazidurie Typ 1**

**Dissertation**

zur Erlangung des Grades einer Doktorin der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von

Ann-Cathrin Dörfler

aus München

Hamburg 2018

Angenommen von der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 25.01.2019

Veröffentlicht mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Thomas Braulke

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Chris Mühlhausen

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>III</b>
<b>1. Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Glutarazidurie Typ 1 .....	1
1.2 Glutaryl-Coenzym-A-Dehydrogenase und pathophysiologische Mechanismen der GA1 .....	3
1.2.1 Glutamat-Exzitotoxizität .....	4
1.2.2 Beeinträchtigung der Integrität von Endothelzellen.....	6
1.2.3 Energiestoffwechsel und anaplerotische Bereitstellung von TCA-Zyklus- Intermediaten.....	6
1.3 Mausmodell der GA1 .....	8
1.4 Gcdh-und Sirtuin 5-assoziierte Glutarylierung mitochondrialer Proteine .....	8
<b>2. Zielsetzung.....</b>	<b>11</b>
<b>3. Material und Methoden .....</b>	<b>12</b>
3.1 Reagenzien, Kits und Assays .....	12
3.2 Mausmodell der GA1 .....	13
3.3 Genotypisierung von Wildtyp- und <i>Gcdh</i> -KO-Mäusen.....	14
3.4 Antikörper .....	14
3.4.1 Primärantikörper.....	14
3.4.2 Sekundärantikörper .....	14
3.5 Westernblot-Analyse.....	15
3.6 Urin- und Serumproben und Präparation von Mitochondrien .....	15
3.7 Immunopräzipitation von Kglu-Peptiden.....	15
3.8 Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (LC-MS) und massenspektrometrische Datenanalyse .....	15
3.9 <i>In vitro</i> Glutarylierung von GDH.....	16

3.10	<i>In vitro</i> Deglutarylierung von GDH durch SIRT5 .....	16
3.11	GCDH-Protein-Interaktionen .....	16
3.12	GDH-Aktivitätsassay .....	16
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>17</b>
4.1	Gewebe- und altersabhängige Proteinglutarylierung in <i>Gcdh</i> -KO-Mäusen .....	17
4.2	Einfluss Hochproteindiät-induzierter enzephalopathischer Krisen auf die Proteinglutarylierung bei <i>Gcdh</i> -KO-Mäusen .....	20
4.3	Proteomanalyse von Lysin-Glutarylierungs-Substraten in Hirn und Leber von <i>Gcdh</i> -defizienten Mäusen .....	22
4.4	Zeit- und Glutaryl-CoA-abhängige <i>in vitro</i> Glutarylierung von GDH .....	24
4.5	Effekt der Glutarylierung auf Proteininteraktionen .....	27
<b>5.</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>30</b>
5.1	Gewebespezifische und Glutaryl-CoA-konzentrationsabhängige Glutarylierung von Proteinen.....	30
5.2	Cerebrale Lysin-Glutarylierung erfolgt ausschließlich in Gliazellen .....	32
5.3	Glutarylierung hemmt Effektor-Bindung und Protein-Protein-Interaktionen der GDH .....	34
5.4	Spielen Proteinglutarylierungen eine Rolle in der Pathogenese der GA1?.....	36
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>37</b>
<b>7.</b>	<b>Summary</b> .....	<b>39</b>
<b>8.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>40</b>
<b>9.</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>46</b>
<b>10.</b>	<b>Publikation und Kongressbeitrag</b> .....	<b>52</b>
<b>11.</b>	<b>Danksagung</b> .....	<b>53</b>
<b>12.</b>	<b>Lebenslauf</b> .....	<b>54</b>
<b>13.</b>	<b>Eidesstattliche Erklärung</b> .....	<b>55</b>

## Abkürzungsverzeichnis

3OHGA	3-Hydroxyglutarsäure
Abb.	Abbildung
Acaa2	3-Ketoacyl-CoA-Thiolase
Aco2	Aconitase
ATP	Adenosintriphosphat
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BSA	„Bovine serum albumine“
Ca5b	Carboanhydrase 5B
CoA	Coenzym A
Cps1	Carbamyl-Phosphat-Synthetase 1
Cs	Citrat-Synthase
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DLST	Dihydrolipoamid-Succinyltransferase
ETF	Elektronen-Transfer Flavoprotein
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
GA	Glutarsäure
GA1	Glutarazidurie Typ 1
GABA	$\gamma$ -Aminobuttersäure
GC	Glutaconsäure
GCDH	Glutaryl-Coenzym-A-Dehydrogenase
Gcdh-KO	Gcdh-Knockout
GDH	Glutamat-Dehydrogenase
Glu-Carnitin	Glutaryl-Carnitin
Glu-CoA	Glutaryl-CoA
GOT	Aspartat-Aminotransferase
HPD	Hochproteindiät
Icdh $\alpha$	Isocitrat-Dehydrogenase Gamma 1
$\alpha$ -KA	$\alpha$ -Keto adipinsäure
kDa	Kilodalton
Kglu	Lysin-Glutarylierung
KO	Knockout

## Abkürzungsverzeichnis

---

LC-MS	„liquid chromatography-mass spectrometry“
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MnSOD	Mangansuperoxiddismutase
MUP	“Major urinary proteins“
NaC3	Na <sup>+</sup> -abhängiger Dicarboxylat-Cotransporter 3
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
Nadk2	NAD Kinase 2
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NO	Stickstoffmonoxid
OAT	Organische-Anionen-Transporter
OGDC	Oxoglutarat-Dehydrogenase-Komplex
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Pc	Pyruvatcarboxylase
Pitrm1	Presequence Protease
rpm	„rounds per minute“
Scot-s	3-Ketosäure-CoA-Transferase
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
SIRT	Sirtuin
Tab.	Tabelle
TCA-Zyklus	Tricarbonsäurezyklus
WT	Wildtyp

# 1. Einleitung

## 1.1 Glutarazidurie Typ 1

Die Glutarazidurie Typ 1 ist eine angeborene neurodegenerative Stoffwechselerkrankung, der Mutationen im Glutaryl-Coenzym-A-Dehydrogenase (GCDH)-kodierenden Gen zugrunde liegen. Die Krankheit wird autosomal-rezessiv vererbt und wurde erstmals 1975 von Goodman beschrieben (Goodman et al. 1975). Die GCDH ist ein mitochondriales Matrixprotein, das am Abbau der Aminosäuren Lysin, Hydroxylysin und Tryptophan beteiligt ist. Bei Funktionsverlust des Enzyms kann das intermediäre Abbauprodukt Glutaryl-CoA nicht weiter abgebaut werden und es kommt in allen Geweben und Körperflüssigkeiten zur Anhäufung der pathologischen sekundären Metaboliten Glutarsäure (GA) und 3-Hydroxyglutarsäure (3OHGA) (Goodman und Frerman 2001).

Bei Geburt sind betroffene Kinder, abgesehen von einer möglichen Makrozephalie, klinisch unauffällig. Während eines vulnerablen Zeitfensters vom 3.-36. Lebensmonat können jedoch katabole Stoffwechsellagen, wie beispielsweise fieberhafte Infektionen oder Impfungen, Durchfallerkrankungen oder Erbrechen, zu einer enzephalopathischen Krise führen. Hierbei kommt es innerhalb weniger Stunden zum bilateralen irreversiblen Untergang von Neuronen im Corpus Striatum und in Folge dessen zu einer dyston-dyskinetischen Bewegungsstörung variabler klinischer Ausprägung (Goodman und Frerman 2001, Hoffmann et al. 1996, Kölker et al. 2006, Strauss et al. 2003).

Zudem zeigt sich bei Patienten nach einer enzephalopathischen Krise häufig eine stammbetonte muskuläre Hypotonie bei parallel bestehender Hypertonie und Dystonie der Extremitäten. Magnetresonanztomografische Aufnahmen des Gehirns zeigen nach einer enzephalopathischen Krise typischerweise bilaterale T2-Hyperintensitäten des Corpus Striatum. Es können aber auch bei Patienten, die noch keine Stoffwechselkrise durchlebt haben, MRT-Veränderungen auftreten, wie beispielsweise T2-Hyperintensitäten des Pallidums oder der weißen Substanz, subdurale Hämatome oder frontotemporale Hypoplasien. Die frontotemporale Hypoplasie kann sich unter den im anschließenden Abschnitt beschriebenen Therapiemöglichkeiten teilweise zurückbilden, sodass sie als metabolisch bedingte Reifungsverzögerung interpretiert wird. Die klinische Bedeutung der anderen extrastriatalen MRT-Veränderungen ist unklar (Harting et al. 2009, Heringer et al. 2010).

Neben neurologischen Symptomen wurden auch funktionelle und histologische Veränderungen in der Niere beschrieben. Etwa 20-25% der GA1-Patienten im Alter von über 20 Jahren leiden an chronischem Nierenversagen (Kölker et al. 2015). Zudem wurden einzelne GA1-Patienten beschrieben, bei denen es, teilweise infektassoziiert, zu akutem Nierenversagen mit Glomerulo- oder Tubulopathien, oder einem nephrotischen Syndrom kam (du Moulin et al. 2017, Pode-Shakked et al. 2014, Poge et al. 1997).

Eine Korrelation zwischen dem klinischen Verlauf eines Patienten einerseits und dem biochemischen Phänotyp oder dem Genotyp andererseits konnte nicht festgestellt werden (Kölker et al. 2006, Strauss et al. 2003).

Das wichtigste Therapieziel bei der GA1 ist es, den Ausbruch einer enzephalopathischen Krise zu verhindern. Grundsäulen der Therapie sind:

1. die Reduktion der Vorläufer-Aminosäuren, die zur Bildung der pathologischen Metaboliten führen, mittels einer Lysin-armen Diät mit gleichzeitiger Gabe von Lysin-freien und Tryptophan-armen Aminosäure-Mischungen,
2. die Supplementation von Carnitin, um intermediäres Glutaryl-CoA zu konjugieren (Detoxifikation) und einen Carnitinmangel zu vermeiden, sowie
3. ein strenges Notfallmanagement während aller Zustände, die zu einer Katabolie führen können (Infekte, Erbrechen, Durchfall) mit Gabe energiereicher, Glukose-basierter Infusionen und einer Einschränkung der Eiweißzufuhr (Boy et al. 2017).

Der letztgenannte Punkt ist der effektivste und wichtigste Schritt zur Vorbeugung einer neuropathischen Schädigung (Boy et al. 2017). Während es bei 65-90% der unbehandelten GA1-Patienten zur Entwicklung einer enzephalopathischen Krise kommt, liegt die Rate der Stoffwechselkrisen bei GA1-Patienten unter dieser Therapie bei 10-35% (Boy et al. 2018, Heringer et al. 2010, Kölker et al. 2006).

Da die Therapiemöglichkeiten nach striatalem Nervenzelluntergang eingeschränkt sind, ist die frühzeitige Erkennung und Behandlung einer GA1 vor dem Auftreten einer enzephalopathischen Krise entscheidend (Boy et al. 2018, Heringer et al. 2010). Seit dem 1. April 2005 wird in Deutschland flächendeckend jedes Neugeborene im Rahmen des erweiterten Neugeborenen Screenings auf GA1 hin untersucht. Im Mittel werden im Neugeborenen Screening jährlich 5-10 Neugeborene in Deutschland mit einer GA1 neu entdeckt, was einer Inzidenz von 1:100.000 Neugeborenen entspricht (Lindner et al. 2006).



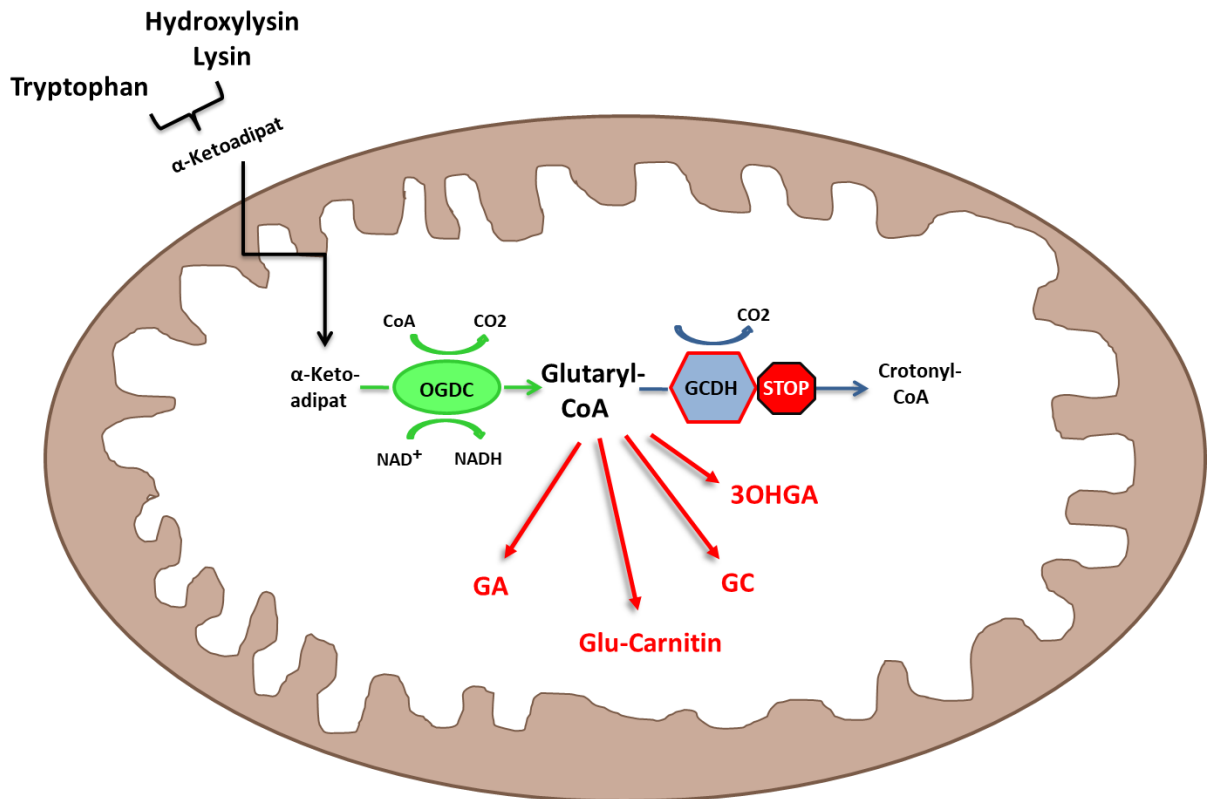
## **1.2 Glutaryl-Coenzym-A-Dehydrogenase und pathophysiologische Mechanismen der GA1**

Die essentiellen Aminosäuren Lysin, Tryptophan und Hydroxylysin werden über unabhängige Stoffwechselwege zu  $\alpha$ -Keto adipinsäure abgebaut. Für Lysin existieren hierbei zwei Abbauwege, der Pipecolinsäureweg, der hauptsächlich in den Peroxisomen und im Zytosol lokalisiert ist, und der Saccharopinweg, der nur in den Mitochondrien stattfindet. Der Pipecolinsäureweg stellt den im reifen Gehirn vorherrschenden Lysin-Abbauweg dar, während der Saccharopinweg im extrazerebralen Gewebe und besonders in der Leber überwiegt (Hallen et al. 2013, Posset et al. 2015). Die gewebespezifische Verteilung der Abbauwege könnte eine bedeutsame Rolle bei der Ausprägung der GA1 in verschiedenen Organen spielen, wurde jedoch in diesem Zusammenhang noch nicht untersucht.

Beide Lysin-Stoffwechselwege münden schließlich mit dem Abbauweg von Tryptophan in eine gemeinsame Endstrecke ein:  $\alpha$ -Keto adipinsäure wird in die Mitochondrien transportiert und vom  $\alpha$ -Ketoglutarat-Dehydrogenase-Komplex (OGDC) unter Verwendung von freiem Coenzym A (CoA) zu Glutaryl-CoA umgesetzt (Abb. 1.1). GCDH katalysiert die nachfolgende oxidative Decarboxylierung von Glutaryl-CoA über Glutaconyl-CoA zu Crotonyl-CoA, welches über weitere Enzyme zu Acetyl-CoA abgebaut wird.

Acetyl-CoA kann anschließend in den Tricarbonsäurezyklus (TCA-Zyklus) eingeschleust werden, womit der Stoffwechsel der Aminosäuren der Energiegewinnung und Bereitstellung von Zwischenprodukten für die Biosynthese von Proteinen, Nukleinsäuren, Fettsäuren, Glukose, Steroiden und Häm dient.

Defekte des GCDH-Enzyms führen folglich zur Akkumulation von Glutaryl-CoA. Durch Abspaltung des CoA bzw. Veresterung mit Carnitin entstehen daraus GA bzw. Glutaryl carnitin (glu-Carnitin). Aus dem Intermediat Glutaconyl-CoA kann durch CoA-Abspaltung Glutaconsäure (GC) und durch Hydrierung und anschließende Abspaltung des CoA 3OHGA entstehen (Abb. 1.1; Westover et al. 2001). Ob die Bildung von GA, 3OHGA und GC enzymatisch oder Enzym-unabhängig verläuft, ist ungeklärt.



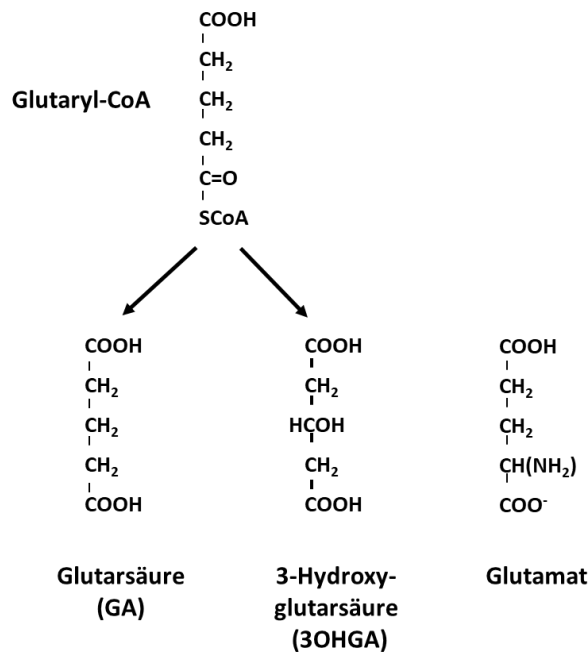
**Abb. 1.1: Schematische Übersicht des gestörten Abbaus von Lysin, Hydroxylysin und Tryptophan bei GCDH-Defizienz.**

OGDC:  $\alpha$ -Ketoglutarat-Dehydrogenase-Komplex; GCDH: Glutaryl-Coenzym-A-Dehydrogenase; GA: Glutarsäure; Glu-Carnitin: Glutarylarnitin; GC: Glutaconsäure; 3OHGA: 3-Hydroxyglutarsäure. Abbildung modifiziert nach Lamp (2011).

Pathophysiologischen Mechanismen, die zur GA1 führen, sind bisher nur unzureichend untersucht worden. Es sind verschiedene Mechanismen beschrieben und diskutiert worden: Exzitoxizität durch Überaktivierung von glutamatergen Rezeptoren, eine beeinträchtigte Integrität der Endothelzellen im Gehirn oder gestörte anaplerotische Supplementierung von Neuronen mit astrozytären TCA-Zyklus-Intermediaten. Im Nachfolgenden werden diese Erklärungsansätze näher erläutert.

### 1.2.1 Glutamat-Exzitoxizität

Wie Abbildung 1.2 zeigt, weisen die bei GA1 akkumulierenden Metaboliten eine strukturelle Ähnlichkeit zum Neurotransmitter Glutamat auf. Aufgrund dieser strukturellen Ähnlichkeit wurde postuliert, dass die akkumulierenden Metaboliten exzitotoxische Wirkungen ähnlich dem Glutamat vermitteln können (Kölker et al. 2004b, Ullrich et al. 1999).



**Abb. 1.2: Strukturelle Ähnlichkeiten der aus Glutaryl-CoA entstehenden Metaboliten GA und 3OHGA zu Glutamat.**

Exzitoxizität beschreibt einen neurotoxischen Mechanismus, der durch eine erhöhte Glutamatkonzentration im synaptischen Spalt und einer dadurch bedingten supra-physiologischen Erregung von glutamatergen Rezeptoren definiert ist. Es wurde daher angenommen, dass erhöhte Konzentrationen von GA und 3OHGA im Gehirn zur dauerhaften Aktivierung des ionotropen NMDA (N-Methyl-D-Aspartat)-Rezeptors führen könnten. Hierbei wurde 3OHGA, da sie GA1-spezifisch ist (Ullrich et al. 1999), die entscheidendere Rolle zugeschrieben, obwohl ihre Gleichgewichtskonzentrationen weit unter denen von GA liegen. Durch die dauerhafte Depolarisierung und folgendem Ca<sup>+</sup>-Einstrom schwillt die Zelle an und es kommt zur Induktion von Nekrose-induzierenden und proapoptotischen Enzymen wie der NO-Synthase oder zur Inhibition wie z. B. der Protein Kinase C und letzten Endes zum Untergang der Zelle (Jafari et al. 2011). Diese Hypothesen basieren jedoch größtenteils auf Befunden an isolierten neuronalen Rattenzellen, die keine GCDH-Defizienz aufwiesen, und die unter unphysiologisch hohen Konzentrationen der Metaboliten gewonnen wurden.

### **1.2.2 Beeinträchtigung der Integrität von Endothelzellen**

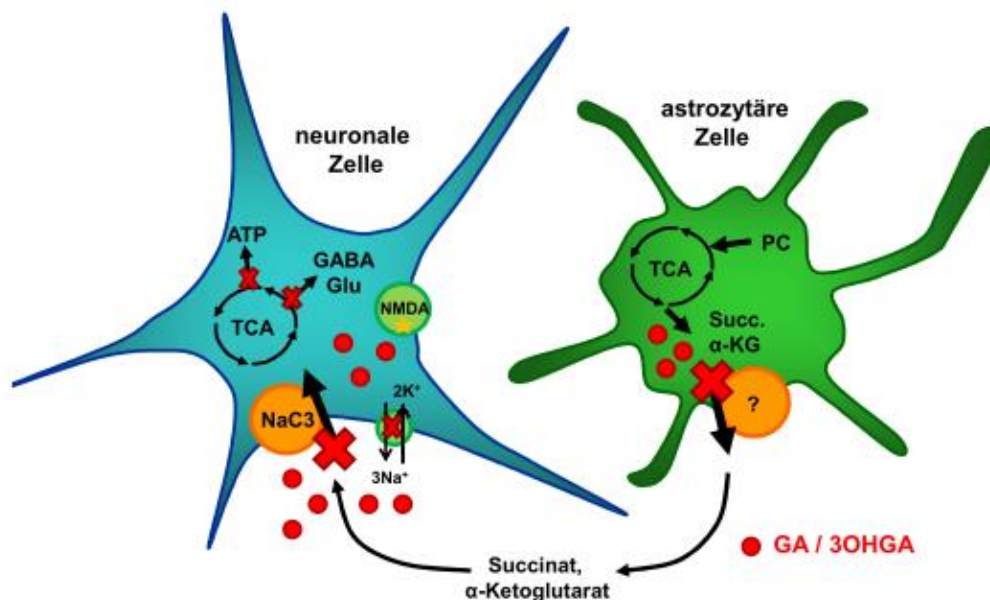
Von Mühlhausen *et al.* (2006) wurde gezeigt, dass 3OHGA die Integrität von Endothelzellen *in vivo* und *in vitro* beeinträchtigt. Es wurde eine erniedrigte Expression von VE-Cadherin, einem Bestandteil der „adherens junctions“ beobachtet, die mit Einblutungen einhergeht, was auf die 30% der GA1-Patienten zutreffen könnte, bei denen subdurale Hämatomate und akute retinale Blutungen auftreten.

Es ist deshalb denkbar, dass es im Rahmen enzephalopathischer Krisen auch zu einer veränderten Permeabilität der Bluthirnschranke (BHS) kommen und so der Untergang von Neuronen des Striatums begünstigt werden könnte. Die Begrenzung der toxischen Wirkung auf das Striatum könnte auf Unterschiede in der frühkindlichen Gefäßentwicklung zwischen diesem und dem restlichen Teil des Gehirns zurückführbar sein (Kuban und Gilles 1985). Befunde von Zinnanti *et al.* (2006), bei denen eine induzierte Krise bei Mäusen zu subarachnoidalen Blutungen führte, stützen zunächst diese Annahme. Funktionelle Untersuchungen mit radioaktiv markierten Metaboliten zeigten jedoch, dass die Permeabilität der BHS im Mausmodell in der Krise unbeeinflusst bleibt (Keyser *et al.* 2008, Sauer *et al.* 2006) und zudem weder zirkulierende GA noch 3OHGA über die BHS transportiert werden (Keyser *et al.* 2008, Mühlhausen *et al.* 2008). Dies lässt darauf schließen, dass neurotoxische Effekte bei der GA1 von endogen im Gehirn synthetisierter GA und 3OHGA vermittelt werden. Die Spezifität der Degeneration striataler Neurone bei GA1 bleibt allerdings weiter unklar.

### **1.2.3 Energiestoffwechsel und anaplerotische Bereitstellung von TCA-Zyklus-Intermediaten**

Die eigene Arbeitsgruppe zeigte, dass extrazelluläre GA und 3OHGA konzentrationsabhängig den anaplerotischen Transfer von TCA-Zyklus-Intermediaten (z. B. Succinat) aus Astrozyten zu Neuronen beeinträchtigen kann (Lamp *et al.* 2011). Der TCA-Zyklus dient in Neuronen der Bereitstellung sowohl von Energie in Form von ATP, als auch von Substraten für die Synthese der Neurotransmitter GABA und Glutamat. Die Umwandlung von Pyruvat zu Oxalacetat durch die Pyruvatcarboxylase dient der Generierung weiterer Intermediate. Da die Pyruvatcarboxylase in Neuronen nicht exprimiert wird, der Bedarf an TCA-Zyklus-Intermediaten jedoch hoch ist, sind Neurone auf den anaplerotischen Transfer u.a. der Dicarboxylate Succinat und  $\alpha$ -Ketoglutarat aus Astrozyten angewiesen (Hertz 2004, Hertz *et al.* 2007, Jitrapakdee *et al.* 2006, Schousboe *et al.* 1997).

Der astrozytäre Efflux dieser Intermediate wird bei GA1 durch intrazellulär akkumulierende GA und 3OHGA kompetitiv gehemmt, was anschließend zu einer verringerten Aufnahme über  $\text{Na}^+$ -abhängige Dicarboxylat-Cotransporter 3 (NaC3) in die Neuronen führt. Da sowohl GA als auch 3OHGA Substrate des NaC3-Transporters sind, ist es sehr wahrscheinlich, dass zusätzlich extrazelluläre GA und 3OHGA die Aufnahme der anaplerotischen Dicarboxylate in Neuronen kompetitiv inhibieren (Lamp et al. 2011, Mühlhausen et al. 2008, Stellmer et al. 2007). Darüber hinaus wird angenommen, dass hohe Konzentrationen von GA ( $K_i \sim 2,2 \text{ mM}$ ) zur Inaktivierung der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase führen (Kölker et al. 2002). Die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase dient der Aufrechterhaltung des Membranpotentials durch den gleichzeitigen Gegentransport von drei  $\text{Na}^+$ -Ionen aus der Zelle und von zwei  $\text{K}^+$ -Ionen in die Zelle entgegen der chemischen Konzentrations- und elektrischen Ladungsgradienten. Da die TCA-Zyklus-Intermediate nur mit dem einwärts gerichteten  $\text{Na}^+$ -Einstrom NaC3-abhängig in die Zelle transloziert werden können, ist die Aufrechterhaltung des extrazellulären  $\text{Na}^+$ -Gradienten essentiell. Eine weitere trans-inhibitorische Blockade könnten GA und 3OHGA durch die Aktivierung von NMDA-Rezeptoren hervorrufen (Kölker et al. 2004a, Ullrich et al. 1999). Eine dadurch verursachte Depolarisation der Plasmamembran inhibiert die [ $^{14}\text{C}$ ]-Succinat-Aufnahme (Yodoya et al. 2006).



**Abb. 1.3: Darstellung postulierter Effekte von GA und 3OHGA auf den anaplerotischen Transfer von TCA-Zyklus-Intermediaten.** Die TCA-Zyklus-Intermediate Succinat (Succ) und  $\alpha$ -Ketoglutarat ( $\alpha$ -KG) werden in Astrozyten über Pyruvat durch die Pyruvatcarboxylase (PC) bzw. den TCA-Zyklus gebildet. Anschließend können sie über einen noch nicht charakterisierten Dicarboxylat-Transporter in den Extrazellulärraum abgegeben und über NaC3 in neuronale Zellen aufgenommen werden. GA und 3OHGA können verschiedene Schritte der anaplerotischen Substitution blockieren (Lamp 2011).

Zusammenfassend wird vermutet, dass in GCDH-defizienten Hirnzellen die intra- und extrazelluläre Akkumulation der Dicarboxylate GA und 3OHGA den anaplerotischen Transfer von TCA-Zyklus-Intermediaten kompetitiv hemmt und die nachfolgende neuronale Depletion eine Erschöpfung des TCA-Zyklus bewirkt, was dadurch sowohl zu einem ATP-Mangel als auch zu einer reduzierten Synthese der Neurotransmitter GABA und Glutamat führt (Abb. 1.3) und letztlich zum Untergang der Neuronen beiträgt (Lamp et al. 2011).

### 1.3 Mausmodell der GA1

Um Pathomechanismen der GA1 besser untersuchen zu können, generierte die Arbeitsgruppe um David Koeller und Steven Goodman eine *Gcdh*-Knockout-Maus (*Gcdh*-KO-Maus; Koeller et al. 2002). Die Deletion der Exone 1-7 im murinen *Gcdh*-Gen führte zum kompletten Verlust der GCDH-Aktivität.

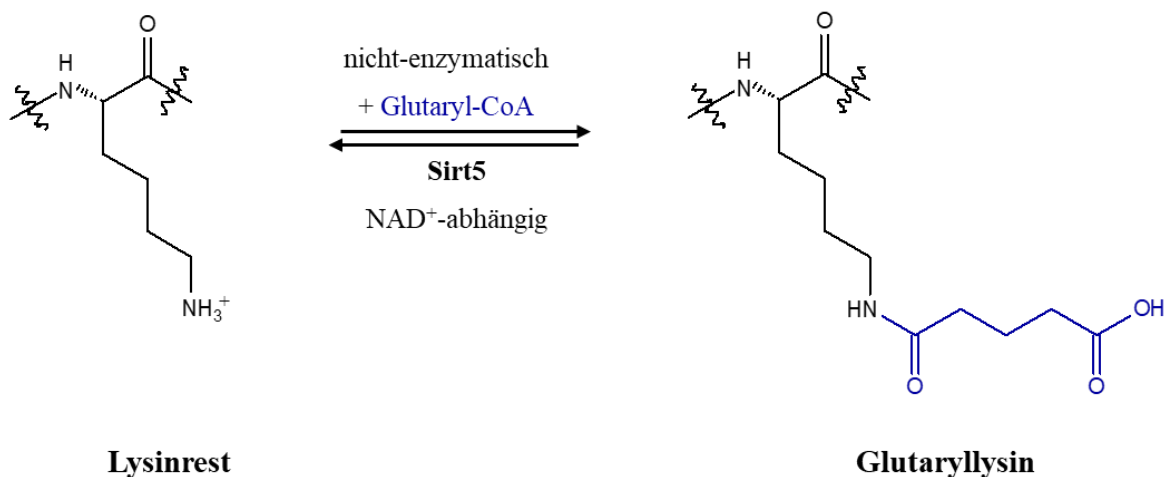
Biochemisch sowie histopathologisch weisen die *Gcdh*-KO-Mäuse einen ähnlichen Phänotyp auf wie GA1-Patienten (Koeller et al. 2002). Eine enzephalopathische Krise entwickeln die Mäuse allerdings nur nach Verfütterung einer Hochproteindiät (HPD) oder einer Lysin-reichen Diät (Zinnanti et al. 2006). Ähnlich wie bei GA1-Patienten, kann die katabole Krise bei *Gcdh*-KO-Mäusen nur in einem frühen Entwicklungsstadium ausgelöst werden, die über einen weiteren Anstieg der GA- und 3OHGA-Konzentrationen im Hirn und allen Körperflüssigkeiten, Vakuolisierungen im Hirn, Krampfanfälle, Paralyse und Nierenschädigungen der proximalen Tubuli nach 3-12 Tagen zum Tod führt (Keyser et al. 2008, Thies et al. 2013, Zinnanti et al. 2006).

### 1.4 *Gcdh*-und Sirtuin 5-assozierte Glutarylierung mitochondrialer Proteine

Um die Funktion und Substratspezifität von Sirtuin (SIRT) 5 zu untersuchen, haben Tan *et al.* (2014) eine *Sirt5*-KO-Maus generiert und dabei nach massenspektrometrischer Analyse eine neue posttranslationale Modifikation mitochondrialer Proteine identifiziert. Es handelt sich dabei um eine Glutarylierung, die an Lysinresten (Kglu) von Proteinen in unterschiedlicher Zahl ohne erkennbares Konsensussequenzmotiv auftritt. Die Glutarylierung führt beim Protein zu einer Ladungsänderung am Lysin, von einer positiven Ladung zur negativ geladenen Glutarylgruppe.

Für Lysin-Glutarylierungen dient analog zu anderen Acylierungen, wie Acetylierung, Propionylierung, Malonylierung, Succinylierung etc. (Wagner et al. 2017), energiereiches Glutaryl-CoA als Substrat für die Konjugation von Glutarylresten an  $\epsilon$ -Aminogruppen von Lysin-Seitenketten. Jedoch unterscheiden sich Glutarylierungen und Modifikationen mit längeren C-Ketten von Acetylierungen, weil sie nicht-enzymatisch unter Bildung eines reaktiven zyklischen Anhydrid-Intermediates verlaufen (Wagner et al. 2017). Die Identifizierung von Glutaryl-CoA als Donor für Lysin-Glutarylierungen ließ vermuten, dass der pathologische Block im Abbau von Lysin, Tryptophan und Hydroxylysin bei GA1, der bis zur Stufe des Glutaryl-CoA abläuft, mit einer übermäßigen Glutarylierung von mitochondrialen Proteinen assoziiert sein könnte. Diese Vermutung konnte durch Analyse von Mitochondrienfraktionen aus Leber von *Gcdh*-KO-Mäusen bestätigt werden, die in Zusammenarbeit zwischen den Arbeitsgruppen Mühlhausen/Braulke (Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf) und Hirschey (Duke University Medical Center, NC) erfolgte (Tan et al. 2014). Exemplarisch wurde für die Carbamyl-Phosphat-Synthetase 1 (Cps1), das Schlüsselenzym im Harnstoffzyklus mit dem höchsten Glutarylierungsgrad in der Leber von *Sirt5*-KO-Mäusen, gezeigt, dass die Aktivität glutarylierter Cps1 gegenüber dem nicht-modifizierten Enzym stark inhibiert war (Tan et al. 2014).

Lysin-Glutarylierungen sind reversibel und können durch SIRT5  $\text{NAD}^+$ -abhängig rückgängig gemacht werden (Tan et al. 2014; Abb. 1.4).



**Abb. 1.4: Prinzip der Lysin-Glutarylierung durch nicht-enzymatischen Transfer von Glutarylgruppen.** Glutaryl-CoA dient als Glutaryl-donor. SIRT5 katalysiert die  $\text{NAD}^+$ -abhängige Deglutarylierung mitochondrialer Proteine.

Sirtuine (SIRT) bilden eine Gruppe von sieben NAD<sup>+</sup>-abhängigen Deacylasen, die ursprünglich als Acetylasen und Mono-ADP-Ribosyltransferasen beschrieben wurden. Sie kommen in allen Lebewesen, vom Bakterium bis zum Säuger, vor und enthalten eine evolutionär konservierte katalytische Zentraldomäne. Die C- und N-Termini variieren und determinieren die subzelluläre Lokalisation und Substratspezifität der Sirtuine. SIRT1 und SIRT2 sind als Deacetylasen im Zellkern und Zytoplasma aktiv (Anderson et al. 2014, Kupis et al. 2016). Auch SIRT3 besitzt Deacetylasefunktion, ist gemeinsam mit SIRT 4 und 5 im Mitochondrium lokalisiert und dadurch direkt mit dem Energiezentrum der Zelle verbunden (Kulkarni und Canto 2017). SIRT4 und SIRT6 weisen ADP-Ribosyltransferaseaktivität auf, zudem entfernt SIRT6, ein nukleäres Sirtuin, langkettige Acylgruppen von Lysinresten (Jiang et al. 2013). SIRT7 wirkt im Nucleolus als Regulator von Zellwachstum und -proliferation (Kupis et al. 2016).

Die Abhängigkeit von NAD<sup>+</sup> verbindet die enzymatische Aktivität der SIRTs mit dem zellulären Stoffwechsel- und Energiestatus, d. h. dem Verhältnis von oxidiertem zu reduziertem NAD (NAD<sup>+</sup>/NADH; van de Ven et al. 2017). Mitochondrialen SIRTs wird hierbei eine wichtige Rolle als Stresssensoren zugeschrieben. Sie tragen durch eine koordinierte Regulation von Substratgruppen zur Erhaltung der metabolischen Homöostase bei. Beispielsweise wird durch Nährstoffmangel beim Menschen die Expression von SIRT3 in Leber und braunem Fettgewebe erhöht und die Energiebereitstellung durch Fettsäureoxidation und Ketonkörperbildung reguliert (Sebastian et al. 2012).

SIRT5 katalysiert neben der Deglutarylierung und Deacetylierung, die Demalonylierung und Desuccinylierung von mitochondrialen Enzymen, die in den Hauptstoffwechselwegen der oxidativen Phosphorylierung, des TCA-Zyklus und der Fettsäureoxidation involviert sind (Du et al. 2011, Hershberger et al. 2017). Obgleich verschiedene Studien vermuten ließen, dass die SIRT5-vermittelte Deacylierung, besonders die Desuccinylierung, wichtig für die Herzfunktion ist und kardioprotektiv wirkt (Tan et al. 2014, Sadhukhan et al. 2016, van de Ven et al. 2017), zeigen herzspezifische *Sirt5*-KO-Mäuse, dass die parallelen SIRT5-abhängigen Deacylierungen in verschiedenen Geweben Voraussetzung für die Stressbewältigung des Herzens sind (Hershberger et al. 2018). In dem Zusammenhang ist die Analyse glutarylierter Proteine im Hirn von *Gcdh*-KO-Mäusen von fundamentaler Wichtigkeit, um die neurodegenerativen Prozesse bei der GA1 zu verstehen.



## 2. Zielsetzung

Die Glutarazidurie Typ 1 ist eine autosomal-rezessiv vererbte Stoffwechselerkrankung. Pathogene Mutationen im Glutaryl-Coenzym A-Dehydrogenase (*GCDH*)-Gen führen zur Unterbrechung des mitochondrialen Abbaus der Aminosäuren Hydroxylysin, Lysin und Tryptophan auf der Stufe des Glutaryl-CoA. Im Rahmen kataboler Krisen kommt es bei GA1-Patienten zum irreversiblen Untergang von Neuronen im Striatum. Die zugrunde liegenden Pathomechanismen sind weitgehend unklar. Kürzlich wurde unter Beteiligung der eigenen Arbeitsgruppe eine neue Form einer regulatorischen posttranslationalen Modifikation von Proteinen beschrieben: die Lysin-Glutarylierung. Die Modifikation ist abhängig von erhöhten mitochondrialen Spiegeln von Glutaryl-CoA, das als Donor für den nicht-enzymatischen Transfer von Glutarylresten auf Lysinseitenketten von Proteinen dient. Es wurde weiterhin gezeigt, dass im Mausmodell der GA1 verschiedene Gewebe Unterschiede im Muster und in der Intensität glutarylierter Proteine aufwiesen.

Daher sollte in dieser Arbeit untersucht werden,

1. ob die Glutarylierung eine Rolle in der Pathogenese der GA1 spielen könnte,
2. was die molekularen Ursachen für die unterschiedliche Beeinträchtigung von Gewebefunktionen sein könnten und
3. ob es altersabhängige Unterschiede in der Glutarylierung von Proteinen gibt, die mit dem Zeitfenster der für enzephalopathische Krisen vulnerablen Phase korrelieren.

Die Schlüsseltechnologie für die Ziele dieser Arbeit ist die Identifizierung der Glutarylierungs-Proteome von *Gcdh*-KO-Mausleber und -hirn. Für das im Hirngewebe der GA1-Maus am stärksten modifizierte Protein, die Glutamat-Dehydrogenase, wurden in der vorliegenden Arbeit die Auswirkungen der Glutarylierung auf die Enzymaktivität, Stabilität und Interaktion mit anderen Proteinen untersucht.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Reagenzien, Kits und Assays

10x IEF Anodenpuffer	Bio-Rad, München
10x IEF Kathodenpuffer	Bio-Rad, München
Agarose	Invitrogen, Karlsruhe
Amicon Ultrazentrifugalfilter mit Ultracel-10-Membran	Merck-Millipore, Darmstadt
3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure (MOPS)	Roth, Karlsruhe
Affi-Gel 10	Bio-Rad, München
AminoLink Plus Immobilization Kit	Thermo Scientific, St. Leon-Rot
Aufgereinigte Glutamat-Dehydrogenase (L-GDH) aus Rindleber	Sigma-Aldrich, München
Bio-Rad Protein Assay	Bio-Rad, München
Bovines Serumalbumin (BSA)	Serva, Heidelberg
Coomassie® Blue R	Serva, Heidelberg
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, München
Enhanced Chemiluminescence-Reagentien (ECL)	Thermo Scientific, St. Leon-Rot
Essigsäure	Merck-Millipore, Darmstadt
Ethanol	Merck-Millipore, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, München
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich, München
Ethylenglycol-bis(aminoethylether)- N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA)	Sigma-Aldrich, München
GDH Activity Assay Kit	Sigma-Aldrich, München
Glutaryl-CoA Lithiumsalz	Sigma-Aldrich, München
Glycin	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid (KCl)	Roth, Karlsruhe
KAPA Mouse Genotyping Hot Start Kit	Peqlab, Erlangen
Luminol	Roth, Karlsruhe
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Sigma-Aldrich, München
Methanol	Merck-Millipore, Darmstadt
Milchpulver	Roth, Karlsruhe

N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure (HEPES)	Roth, Karlsruhe
NAD <sup>+</sup>	Sigma-Aldrich, München
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Nonidet P40 (NP40)	Roche, Mannheim
p-Cumarinsäure	Sigma-Aldrich, München
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Serva, Heidelberg
Phosphate-buffered saline (PBS)	Life Technologies, Darmstadt
Protein G Sepharose 4 Fast Flow	GE Healthcare, Freiburg
Proteininhibitorgemisch	Sigma-Aldrich, München
Protran® Nitrocellulosemembran	Whatman, Dassel
Rekombinantes humanes SIRT5	Merck-Millipore, Darmstadt
Saccharose	Roth, Karlsruhe
Salzsäure (HCl)	Merck-Millipore, Darmstadt
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich, München
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Sigma-Aldrich, München
Tween 20	Sigma-Aldrich, München
Whatman-Papiere	Roth, Karlsruhe
Zeba Spin Desalting Columns and Plates, 7K MWCO	Thermo Scientific, St. Leon-Rot

### 3.2 Mausmodell der GA1

Die für die Versuche verwendeten GAexp-Tiere der F1-Generation stammen aus der Kreuzung heterozygoter Tiere der Mauslinien GAC57B16 und GASJ129 (Prof. D. M. Koeller, Portland, USA; „Hybrid vigour“-Kreuzungsverfahren, Koeller et al. 2002). Die Genotypen wurden mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) überprüft und bestätigt. Untergebracht waren die Mäuse in der Forschungstierhaltung des Universitätsklinikum mit einem 12-Stunden-Hell-Dunkel-Rhythmus und Wasser und Futter *ad libitum*.

Die Genehmigungen der Behörde für Arbeit, Gesundheit und Soziales der Freien und Hansestadt Hamburg für die Tierhaltung und die Tötung der Tiere zum Zwecke der Organentnahme gemäß § 6 Abs. 1 Satz 2 Nr. 4 TierSchG vom 26.09.2001 (AZ G21132/591-00.33) sowie zur Durchführung der in diesem Antrag beschriebenen Tierversuche (Genehmigung vom 2.6.2005, AZ 26/05) und Ergänzungsgenehmigung vom 01.06.2006 und 30.06.2008 zur Haltung der Tiere in metabolischen Käfigen liegen vor.

Die Durchführung der Normaldiät bzw. Hochproteindiät zur Induktion einer enzephalopathischen Krise erfolgte wie vorbeschrieben (Thies et al. 2013). Für die vorliegende Studie wurden eingefrorene Organ- und Gewebeproben aus früheren Versuchen verwendet.

### 3.3 Genotypisierung von Wildtyp- und *Gcdh*-KO-Mäusen

Die Isolierung genomischer DNA aus Schwanzbiopsien der Mäuse sowie deren Genotypisierung erfolgte mit dem „KAPA Mouse Genotyping Hot Start Kit“ nach Herstellerangaben. Analysiert wurden die Längen der amplifizierten PCR-Produkte nach elektrophoretischer Auftrennung in 1,5%-igen Agarosegelen. Als Vergleich dienten DNA-Längenstandards von Wildtyp (WT)- bzw. *Gcdh*-KO-Mäusen.

### 3.4 Antikörper

Zur Westerblot (WB)-Analyse verwendete primäre und sekundäre Antikörper.

#### 3.4.1 Primärantikörper

Primärantikörper	Spezies	Verdünnung	Hersteller
DLST	Maus	WB 1:500	Sigma-Aldrich, München
ETFB	Kaninchen	WB 1:1000	Abcam, Cambridge, UK
GCDH	Kaninchen	WB 1:5000	Dr. M. Woontner, Denver, USA
GDH	Kaninchen	WB 1:1000	Abcam, Cambridge, UK
Kglu	Kaninchen	WB 1:1000	Schmiesing <i>et al.</i> 2018
MnSOD	Kaninchen	WB 1:500	Merck Millipore, Darmstadt
Mup	Kaninchen	WB 1:200	Santa Cruz, Santa Cruz, USA
Sirt5	Kaninchen	WB 1:1000	Abcam, Cambridge, UK
$\alpha$ -Tubulin	Maus	WB 1:1000	Sigma-Aldrich, München

#### 3.4.2 Sekundärantikörper

Sekundärantikörper	Verdünnung	Hersteller
Ziege $\alpha$ Kaninchen IgG HRP	WB 1:5000	Dianova, Hamburg
Ziege $\alpha$ Maus	WB 1:2000	Dianova, Hamburg

### **3.5 Westernblot-Analyse**

Anhand des Westernblot-Verfahrens wurden gelöste Proteine zur Immundetektion mittels SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Nach Blockierung freier Proteinbindungsstellen auf der Nitocellulosemembran mit Milchproteinextrakten oder in Puffer gelöstem Rinderserumalbumin folgte die Inkubation mit dem passenden Primärantikörper und danach mit dem entsprechenden HRP-gekoppelten Sekundärantikörper. Sichtbar gemacht wurden die gebundenen Antikörper durch eine *Enhanced Chemiluminescence* (ECL)-Reaktion (Schmiesing et al. 2018).

### **3.6 Urin- und Serumproben und Präparation von Mitochondrien**

Urin- und Serumproben von WT- und *Gcdh*-KO Mäusen unterschiedlichen Alters wurden unmittelbar nach Präparation tiefgefroren und bei -80° C bis zur Verwendung gelagert.

Zur Gewinnung von mitochondrialen Fraktionen wurden Leber- und Hirngewebe mit 4 Hüben und Nieren- und Milzgewebe mit 8 Hüben in einem rotierenden Teflon-Potter-Elvehjem-Homogenator bei 1600 rpm in Homogenisierungspuffer (10 mM Tris–MOPS [pH 7,4], 1 mM EGTA/Tris, 200 mM Saccharose) und Proteaseinhibitoren homogenisiert. Die Mitochondrienfraktionen wurden wie vorher beschrieben (Frezza et al. 2007) präpariert und für Westernblot-Analysen verwendet.

### **3.7 Immunopräzipitation von Kglu-Peptiden**

Die Immunopräzipitation von Kglu-Peptiden wurde mit kleinen Abänderungen entsprechend Chen *et al.* (2003) durchgeführt. Anstelle von kultiviertem Zellmaterial wurde mit Hirn- und Lebergewebe von Mäusen gearbeitet. Die genaue Durchführungsweise ist in Schmiesing *et al.* (2018) beschrieben.

### **3.8 Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (LC-MS) und massenspektrometrische Datenanalyse**

Die Generierung der glutarylierten Peptide aus Mausleber und –hirn, deren Trennung an C18-Säulen mittels nano-HPLC und die anschließende Analyse mittels einem LTQ-Orbitrap-Velos-Massenspektrometer wurde in Kooperation mit Frau Dr. Melanie Thelen

und Herrn Dr. Marc Sylvester (Biochemisches Institut der Universität Bonn) durchgeführt und ausgewertet.

### **3.9 *In vitro* Glutarylierung von GDH**

Für die *in vitro* Glutarylierung wurde aufgereinigte GDH aus Rinderleber in einer Konzentration von 1 mg/ml im Glutarylierungspuffer (50 mM HEPES [pH 8,0], 150 mM NaCl und Proteaseinhibitoren) gelöst und unter Zusatz von 5 mM Glutaryl-CoA für 4 Stunden bei 400 rpm und 37°C inkubiert. Um die Entstehung eines Kondensats zu minimieren, wurden die Proben einmal stündlich kurz anzentrifugiert.

### **3.10 *In vitro* Deglutarylierung von GDH durch SIRT5**

*In vitro* glutarylierte GDH wurde mittels Amicon-Ultrafiltrationsfiltern Ultracel-10 konzentriert und in einem SIRT5-Assaypuffer (50 mM Tris-HCl [pH 8,0], 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl und 1 mM NAD<sup>+</sup>) aufgenommen. Der Deglutarylierungsansatz enthielt 3 µg glutarylierte GDH und 10 µg SIRT5 in einem Endvolumen von 50 µL und wurde für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Hinzufügen von Solubilisierungspuffer und Inkubation bei 95°C für 5 min beendet.

### **3.11 GCDH-Protein-Interaktionen**

Proteininteraktionen wurden mit GCDH-His6-Chelat-Sepharose durch Pull-Down-Ansätze wie bei Schmiesing *et al.* (2018) durchgeführt. Die Protein-GCDH-Komplexe wurden durch SDS-PAGE getrennt und im Westernblot nachgewiesen.

### **3.12 GDH-Aktivitätsassay**

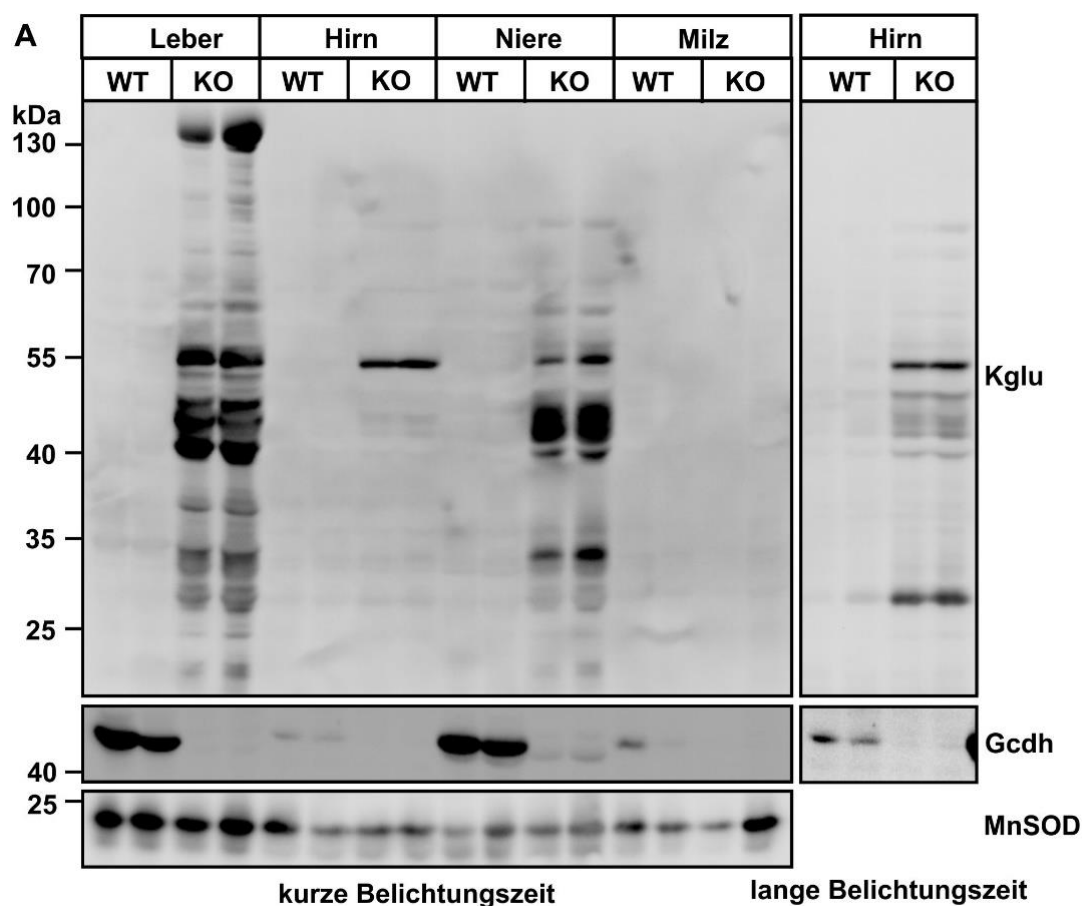
Messungen der Enzymaktivität wurden mit Hilfe des GDH-Assay-Kits nach Herstellerangaben vorgenommen.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Gewebe- und altersabhängige Proteinglutarylierung in *Gcdh*-KO-Mäusen

Vor kurzem wurden in Leberextrakten von *Gcdh*-KO-Mäusen viele glutarylierte mitochondriale Proteine nachgewiesen (Tan et al. 2014). Die Leber ist das Organ mit der höchsten GCDH-Expression und somit auf das Gewebe bezogen der höchsten GCDH-Aktivität (Goodman und Frerman 2001). Folglich hat eine GCDH-Defizienz hier große Auswirkungen auf akkumulierende Glutaryl-CoA-Konzentrationen. Da es im Rahmen akuter enzephalopathischer Krisen bei GA1-Patienten vor allem zum Untergang von Neuronen im Striatum kommt und im chronischen Verlauf der Erkrankungen auch pathologische Veränderungen der Niere beschrieben sind (Keyser et al. 2008, Kölker et al. 2015, Thies et al. 2013, Zinnanti et al. 2006), wurden Mitochondrienextrakte der verschiedenen Organe (Leber, Hirn und Niere) im Hinblick auf spezifische Glutarylierungsmuster untersucht.

Abbildung 4.1 zeigt das Glutarylierungsmuster von Leber, Hirn, Niere und Milz von 6 Wochen alten Mäusen. Es lassen sich deutliche Unterschiede zwischen Wildtyp (WT)- und *Gcdh*-KO-Extrakten erkennen. In Anwesenheit von GCDH, wie es bei WT-Mäusen der Fall ist, sind keine Proteinglutarylierungen nachweisbar. In der Milz von *Gcdh*-KO-Mäusen waren ebenfalls keine glutarylierten Proteine detektierbar. Dagegen sind in Leber und Niere von *Gcdh*-KO-Mäusen ähnlich hohe Spiegel an glutarylierten Proteinen mit geringen gewebespezifischen Unterschieden nachweisbar. In mitochondrialen Extrakten aus Hirn von *Gcdh*-KO-Mäusen sind nur wenige glutarylierte Proteine darstellbar. Bei längerer Belichtung offenbaren sich im Hirn aber deutlich zwei Polypeptidbanden von 55 und 27 kDa. In Leber und Niere finden sich zusätzliche stark immunreaktive Kglu-Banden zwischen 40 und 50 kDa.

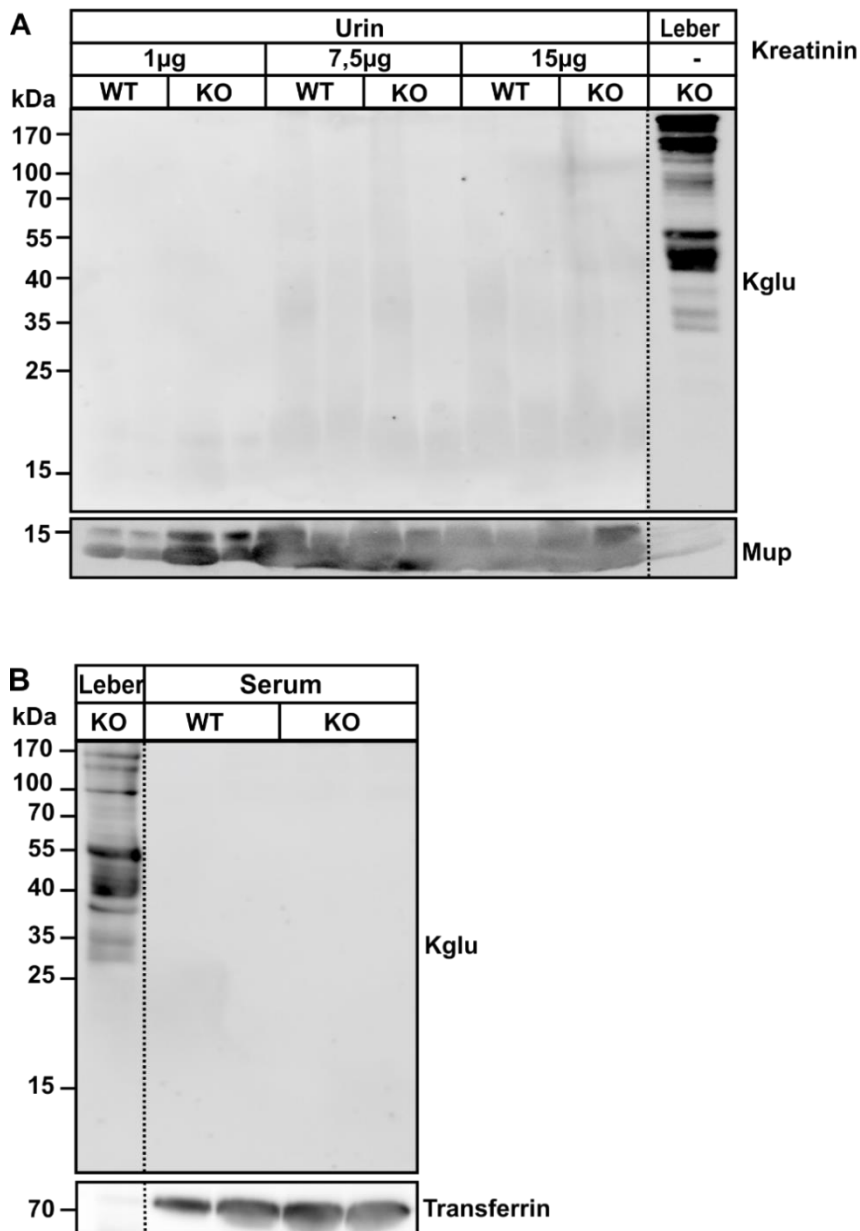


**Abb. 4.1: Organspezifische Glutarylierungsmuster in Mitochondrienextrakten aus Leber, Hirn, Niere und Milz von WT- und *Gcdh*-KO-Mäusen.** Die Expression von *Gcdh* und der mitochondrialen Mangan-abhängigen Superoxiddismutase (MnSOD) dienten als Kontrollen.

GA und 3OHGA weisen bei *Gcdh*-KO-Mäusen während metabolischer Krisen auch in den Körperflüssigkeiten eine erhöhte Konzentration auf (Zinnanti et al. 2006). Um zu untersuchen, ob glutarylierte Proteine sezerniert werden können, folgten Westernblot-Analysen von Urin und Serum. Abbildung 4.2 zeigt, dass weder im Urin noch im Serum von *Gcdh*-KO-Mäusen glutarylierte Proteine nachweisbar waren.

Aufgrund des Zeitfensters, in dem bei Kindern katabole Zustände zu enzephalopathischen Krisen führen, wurde der Frage nachgegangen, ob *Gcdh*-KO-Mäuse altersabhängige Unterschiede im Ausmaß der Glutarylierungsintensität oder des -musters aufzeigen. Bereits 3 Wochen alte Mäuse weisen in Mitochondrienextrakten von Hirn, Leber und Nieren eine deutliche Proteinglutarylierung auf. Während das Muster ähnlich bleibt, nimmt die Intensität zwischen 6 Monate bis 1 Jahr alten Mäusen in Leber und Nieren zu (Abb. 4.3 B/C).





**Abb. 4.2: Abwesenheit von Proteinglutarylierung im Urin oder Serum von *Gcdh*-KO-Mäusen.**

A) Kglu-spezifischer Westernblot entsalzter Urinproben von WT- und *Gcdh*-KO-Mäusen in Abhängigkeit der eingesetzten Kreatinin-Konzentrationen. Hepatischer Mitochondrienextrakt einer *Gcdh*-KO-Maus (25 µg Protein) sowie der Nachweis des *Major urinary proteins* (Mup) dienten als Kontrollen.

B) Kglu-Westernblot-Analyse von je zwei WT- und *Gcdh*-KO-Mauseren.

Im Hirngewebe ist die Zunahme der Signalstärke am ehesten auf Beladungsunterschiede des Gels zurückzuführen, wie die Unterschiede in der Menge der MnSOD-Bande vermuten lassen (Abb. 4.3 A).

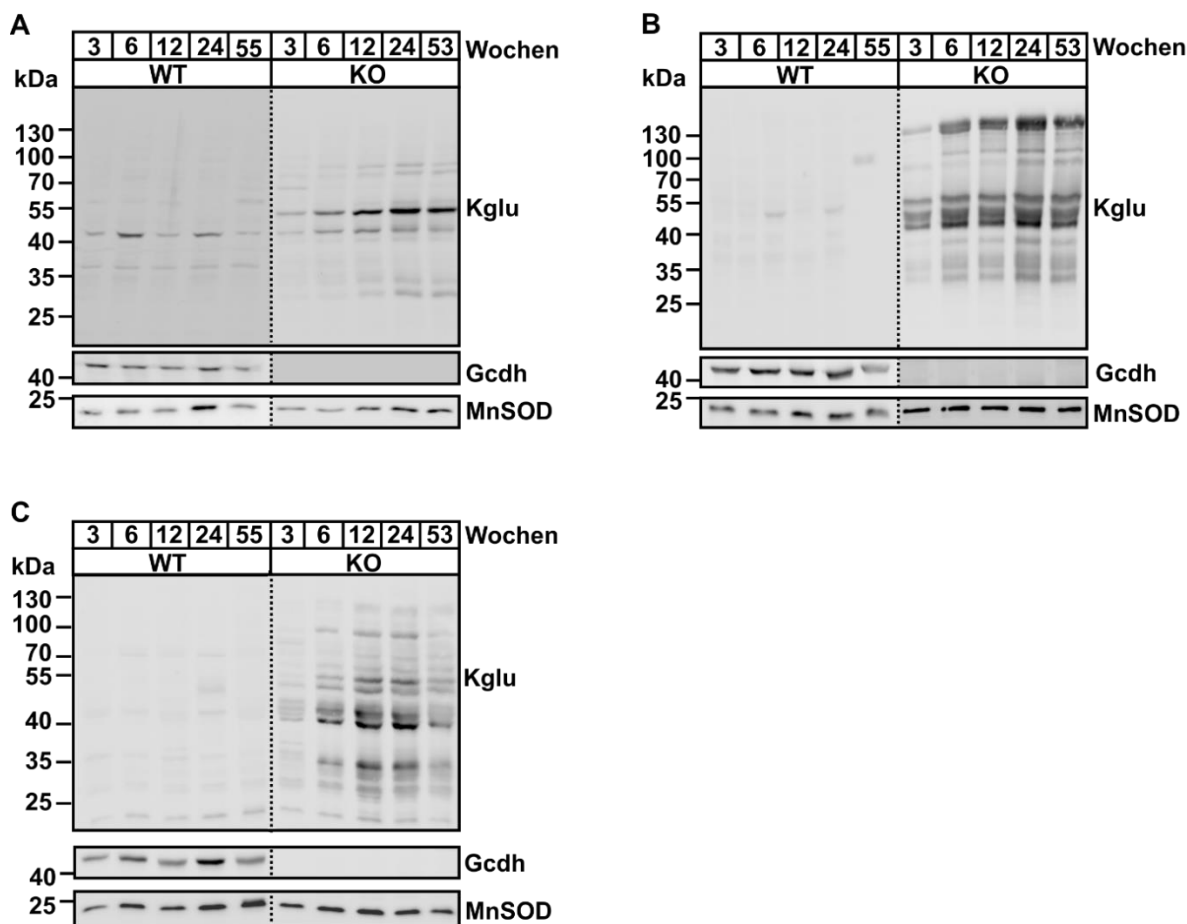
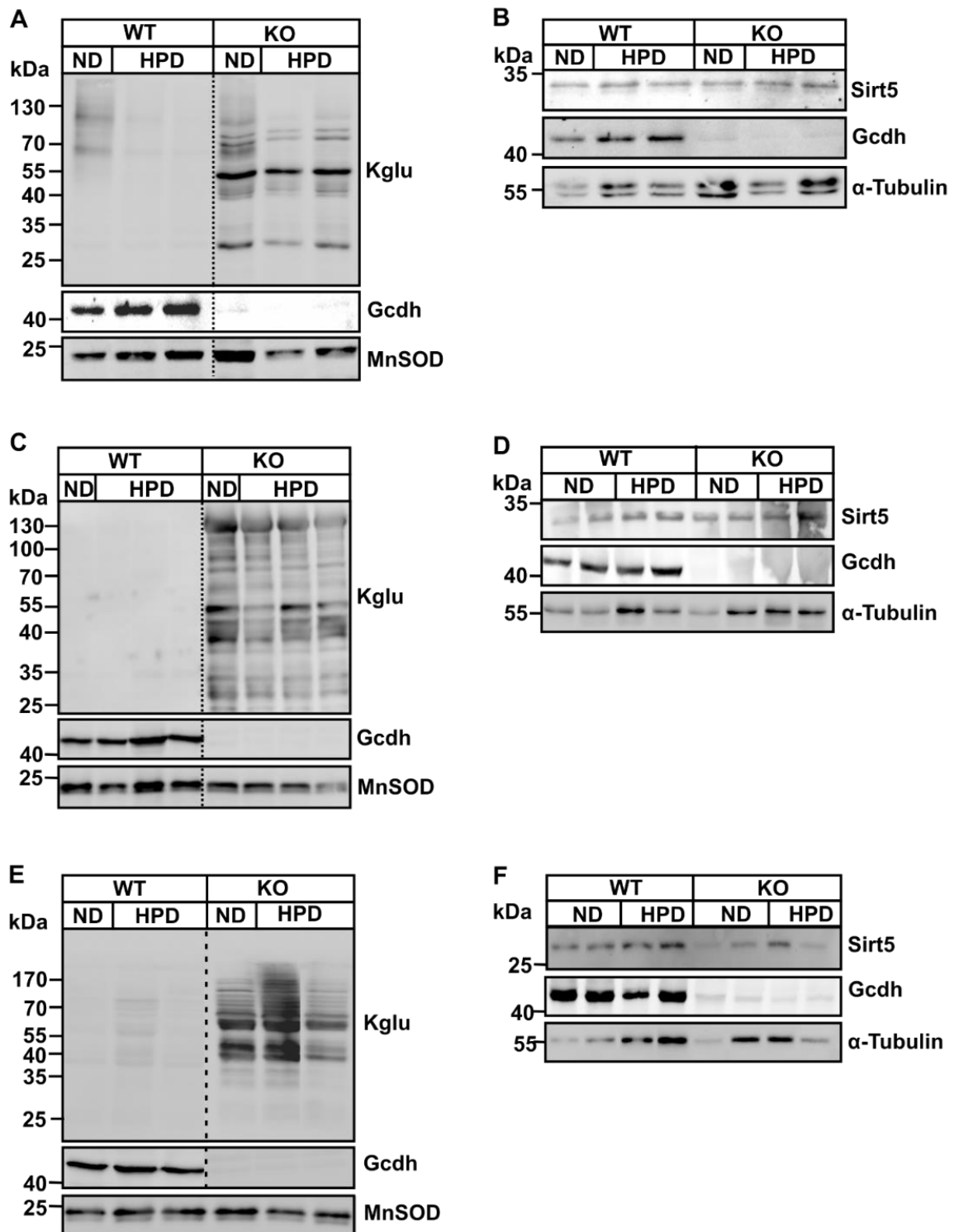


Abb. 4.3: Altersabhängige Glutarylierung mitochondrialer Proteine aus Hirn (A), Leber (B) und Nieren (C) von *Gcdh*-KO-Mäusen. *Gcdh*- und MnSOD-Expression dienten als Kontrollen.

## 4.2 Einfluss Hochproteindiät-induzierter enzephalopathischer Krisen auf die Proteinglutarylierung bei *Gcdh*-KO-Mäusen

Durch Applikation einer Hochproteindiät (HPD) lässt sich bei jungen *Gcdh*-KO-Mäusen innerhalb eines definierten Zeitfensters eine metabolische Krise induzieren. Dabei zeigen sich neben der schrittweisen 4-tägigen klinischen Verschlechterung auch Veränderungen verschiedener biochemischer, metabolischer und morphologischer Parameter (Keyser et al. 2008, Thies et al. 2013, Zinnanti et al. 2006). Um die Auswirkungen der induzierten Krise auf die Proteinglutarylierung zu untersuchen, wurde das Glutarylierungsmuster von Mitochondrienextrakten aus Hirn, Leber und Niere von 6 Wochen alten WT- und *Gcdh*-KO-Mäusen nach 4-tägiger Normaldiät (ND) und HPD im Westernblot untersucht (Abb. 4.4).



**Abb. 4.4:** Eine bei *Gcdh*-KO-Mäusen durch Hochproteindiät induzierte metabolische Krise hat keinen Einfluss auf die Proteinglutarylierung im Hirn (A+B), in der Leber (C+D) oder der Niere (E+F) im Vergleich zur Situation ohne metabolische Krise unter Normaldiät (ND).

A/C/E) Kglu-Westernblot-Analyse mitochondrialer Hirn-, Leber- und Nierenextrakte von 6 Wochen alten WT- und *Gcdh*-KO-Mäusen. Die Tiere wurden entweder für 4 Tage mit ND oder HPD gefüttert. Gcdh- und MnSOD-Expression dienten als Kontrollen.

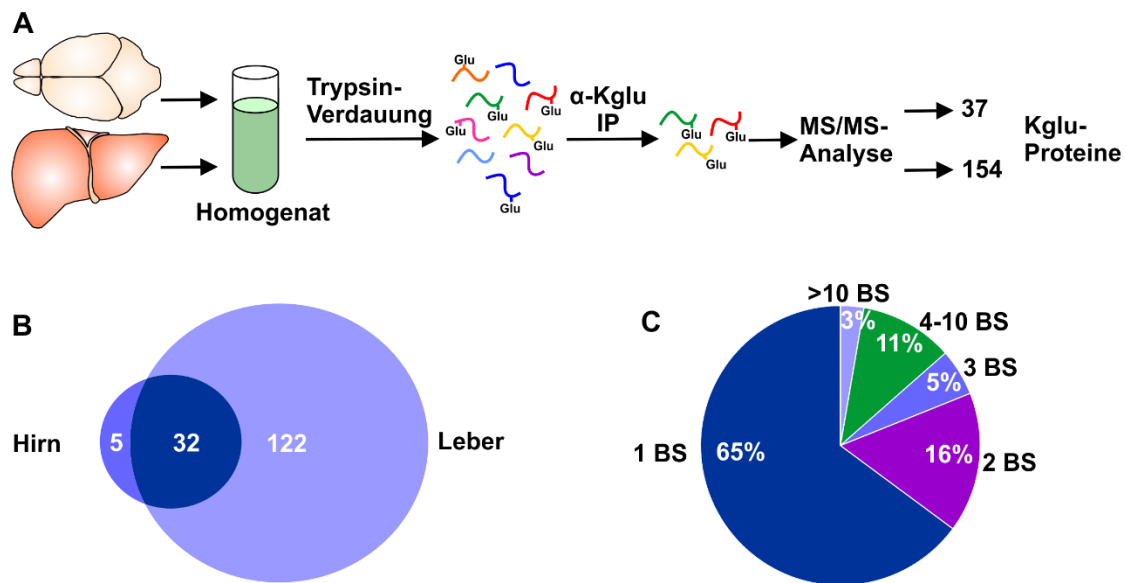
B/D/F) Sirt5-Immuno blot von Mitochondrienextrakten (A/C/E) aus WT- und *Gcdh*-KO-Mäusen. Gcdh- und  $\alpha$ -Tubulin-Expression dienten als Kontrollen.

Wie erwartet waren bei WT-Mäusen in keinem der Organe glutarylierte Proteine nachweisbar. In den Organen der *Gcdh*-KO-Mäuse ließen sich unter den Bedingungen der HPD-induzierten metabolischen Krise weder Veränderungen im Muster noch der Intensität der glutarylierten Proteine im Vergleich zu mit ND-behandelten *Gcdh*-KO-Mäusen feststellen.

Um auszuschließen, dass eine erhöhte Sirt5-Expression und damit eine Erhöhung der Aktivität unter HPD potentielle Veränderungen in der Intensität der Proteinglutarylierung in *Gcdh*-KO-Mäusen kompensiert, wurde die SIRT5-Konzentration in den Gewebeextrakten mittels Westernblot analysiert. Es zeigten sich keine Hinweise für eine Gegenregulation zur Proteinglutarylierung durch eine erhöhte Sirt5-Expression (Abb. 4.4 B/D/F).

### **4.3 Proteomanalyse von Lysin-Glutarylierungs-Substraten in Hirn und Leber von *Gcdh*-defizienten Mäusen**

Zur Identifizierung der Zielproteine für die Glutarylierung hat Frau Dr. Jessica Schmiesing (Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin der Universität Hamburg, Sektion Biochemie) in Kooperation mit Frau Dr. Melanie Thelen und Herrn Dr. Marc Sylvester (Biochemisches Institut der Universität Bonn) eine Kglu-Proteomanalyse durchgeführt. Hierzu wurden Fraktionen aus Hirn und Leber 6 Wochen alter *Gcdh*-KO-Mäuse verwendet. Die Ultraschall-behandelten und Detergenz-haltigen Homogenate wurden tryptisch verdaut und glutarylierte Peptide mit Hilfe von Antikörpern gegen Glutarylreste immunopräzipitiert ( $\alpha$ -Kglu-IP). Anschließend erfolgte eine Analyse durch Massenspektrometrie (MS). Es wurden 73 Kglu-Bindungsstellen an 37 mitochondrialen Proteinen im Hirn und 425 Kglu-Bindungsstellen an 154 mitochondrialen Proteinen in der Leber (Abb. 4.5 A) identifiziert. Die mitochondriale Lokalisation glutarylierter Proteine stimmt mit den Daten der Immunogold-Elektronenmikroskopie überein (Dr. Michaela Schweizer, Zentrum für Molekulare Neurobiologie Hamburg; Schmiesing et al. 2018).



**Abb. 4.5: Kglu-Substrat-Proteomanalyse in WT- und *Gcdh*-KO-Maushirn und -leber.**

- A) Experimentelle Herangehensweise zur Identifizierung glutarylierter Peptide: Auf die Homogenisierung von murinem Hirn- und Lebergewebe erfolgte der tryptische Verdau zu Peptid-Fragmenten, aus denen glutarylierte Peptide spezifisch immunisoliert und mittels MS analysiert wurden.
- B) Im Venn-Diagramm ist die Anzahl der glutarylierten Proteine dargestellt, die nur im Hirn- (5) oder nur im Lebergewebe (122) oder in beiden Geweben (32) von *Gcdh*-KO-Mäusen identifiziert wurden.
- C) Verteilung der jeweiligen Anzahl von Kglu-Bindungsstellen (BS) pro identifiziertem glutaryliertem Protein im *Gcdh*-KO-Maushirn.

Etwa ein Viertel der Proteine wurde sowohl im Hirn als auch in der Leber glutaryliert vorgefunden (Abb. 4.5 B). Rund 80 % der Proteine im Hirn wiesen nur eine oder zwei, 14% (5 Proteine) mehr als drei potentielle Kglu-Bindungsstellen auf (Abb. 4.5 C). Unter Letztere fallen die Glutamat-Dehydrogenase 1 (Gdh, 11 Stellen), Aconitase (Aco2, 6 Bindungsstellen) und Citrat-Synthase (Cs, 4 Stellen). Weitere 5 Proteine wurden ausschließlich im Hirn und nicht in der Leber glutaryliert: 3-Ketosäure-CoA-Transferase (Scot-s, wird in der adulten Mausleber allerdings auch nicht exprimiert), Carboanhydrase 5B (Ca5b), Isocitrat-Dehydrogenase Gamma 1 (Icdh subunit  $\alpha$ ), NAD Kinase 2 (Nadk2) und Presequence Protease (Pitrm1) (Anhang Tab. 8.1).

Im Lebergewebe der *Gcdh*-KO-Mäuse besaßen zwei Drittel der Proteine nur eine oder zwei Kglu-Bindungsstellen, wohingegen folgende 4 Proteine ausgesprochen stark glutaryliert waren: Carbamyl-Phosphat-Synthetase 1 (Cps1, 36 Stellen), 3-Ketoacyl-CoA-Thiolase (Acaa2, 14 Stellen), Glutamat-Dehydrogenase (Gdh, 14 Stellen) und Aspartat-Aminotransferase (Got2, 12 Stellen). Im Hirn wurden Acaa2 und Got2 an jeweils einer Stelle

modifiziert, Cps1 überhaupt nicht. 122 der in der Leber identifizierten Proteine konnten im Hirn nicht als glutaryliert nachgewiesen werden (Abb. 4.5 B, Anhang Tab. 8.1).

Aus dieser Analyse hat sich das Thema für die vorliegende Promotionsarbeit ergeben. Ziel ist die Beantwortung der Frage, welche Auswirkungen die Glutarylierung, am Beispiel der an 11 verschiedenen Lysinresten modifizierten GDH, im Hirngewebe auf die Enzymaktivität und die Interaktion mit anderen mitochondrialen Proteinen hat und ob sich daraus ein Pathomechanismus für die GA1 ableiten lässt.

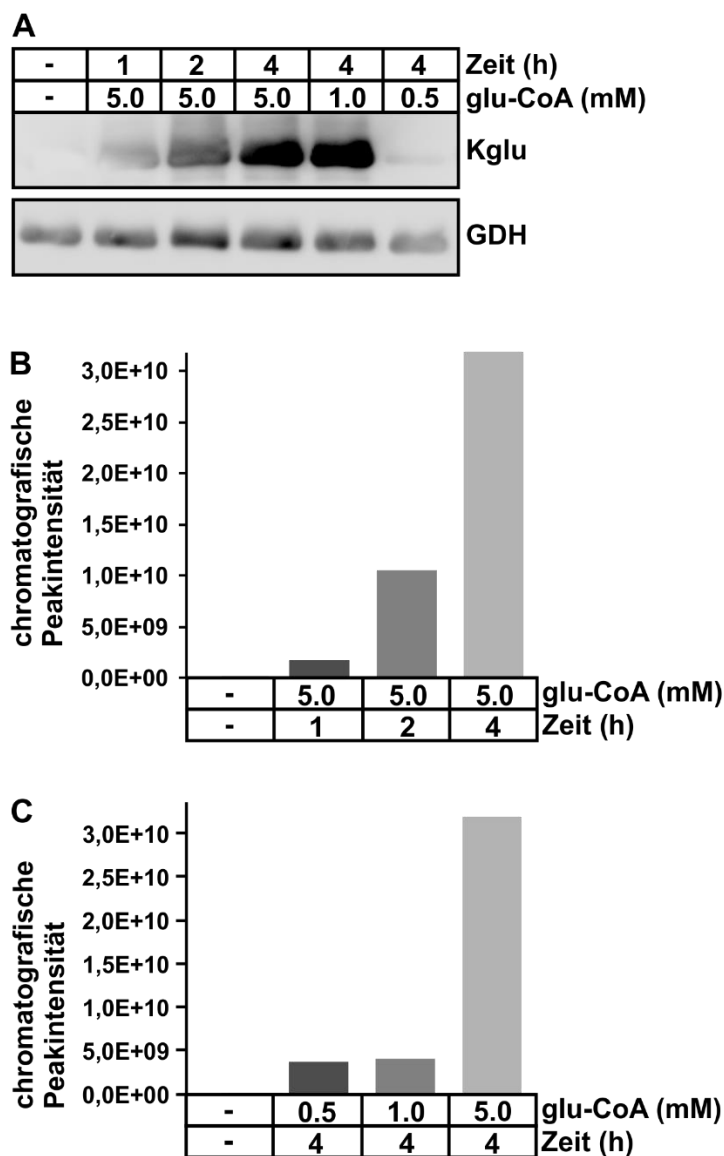
GDH, ein in den Mitochondrien vorkommendes Enzym, katalysiert die reversible oxidative Desaminierung von Glutamat zu  $\alpha$ -Ketoglutarat, wobei NADH und Ammonium-Ionen entstehen. Damit ist GDH für den Stickstoff- und Glutamatmetabolismus von zentraler Bedeutung. Über die Bereitstellung von  $\alpha$ -Ketoglutarat, das im TCA-Zyklus der ATP-Bildung dient, trägt sie zur Aufrechterhaltung der Energiehomöostase bei. Da Neuronen auf den anaplerotischen Transfer von TCA-Zyklus-Intermediaten aus Gliazellen angewiesen sind (Jitrapakdee et al. 2006), fällt der GDH im Gehirn eine wichtige Rolle zu. Nicht nur für den Energiemetabolismus, auch für den Neurotransmitterstoffwechsel ist sie hier bedeutsam. Neuronen benötigen  $\alpha$ -Ketoglutarat, um daraus mittels GDH den exzitatorischen Neurotransmitter Glutamat und daraus wiederum den inhibitorischen Transmitter  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA) zu synthetisieren. Außerdem ist die Aufnahme von Glutamat aus dem synaptischen Spalt in Astrozyten, wo ein Großteil wieder oxidativ desaminiert wird und in den TCA-Zyklus eintritt, während einer exzitatorischen Erregungsweiterleitung entscheidend, um Exzitotoxizität zu vermeiden (Schousboe et al. 2014).

#### **4.4 Zeit- und Glutaryl-CoA-abhängige *in vitro* Glutarylierung von GDH**

Durch die nicht-enzymatische *in vitro* Glutarylierung von aufgereinigter GDH aus Rinderleber unter standardisierten Bedingungen standen größere Mengen dieses Enzyms für die nachfolgenden Untersuchungen zur Verfügung. Hierzu wurde GDH zunächst mit 5 mM Glutaryl-CoA (glu-CoA) für 4 Stunden inkubiert. Überraschenderweise ließen die Arbeiten von Frau Dr. Makrypidi (Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin der Universität Hamburg, Sektion Biochemie) zur isoelektrischen Fokussierung und 2D-SDS-Elektrophorese sowie die anschließende Kglu-Westernblot-Analyse als Teil des gemeinschaftlichen Gesamtprojektes vermuten, dass GDH in einer niedrigen Stöchiometrie

modifiziert wurde, d. h. die meisten GDH-Moleküle sind nur an einem, aber jeweils verschiedenen Lysinresten glutaryliert.

Diese Annahme konnte durch detailliertere *in vitro* Versuche zur Zeit- und Glutaryl-CoA-Konzentrations-Abhängigkeit und nachfolgender massenspektrometrischer Analysen bestätigt werden (Abb. 4.6).



**Abb. 4.6: Zeit- und Glutaryl-CoA-abhängiger Anstieg der GDH-Glutarylierung *in vitro*.**

- A) Kglu-spezifischer Westernblot von *in vitro* glutarylierter boviner GDH in Abhängigkeit von Inkubationszeit und Glutaryl-CoA-Konzentration. Aliquots derselben Proben wurden für die MS-Analyse (B) verwendet.
- B) MS-Analyse *in vitro* glutarylierter GDH in Abhängigkeit von der Inkubationszeit. Aufgetragen wurden die addierten Peakbereiche aller durch Ionenchromatographie isolierten Glutaryl-Peptide einer Probe.
- C) MS-Analyse *in vitro* glutarylierter GDH (Abb. 4.6 A) in Abhängigkeit von der Glutaryl-CoA-Konzentration. Aufgetragen wurden die addierten Peakbereiche aller glutarylierten Peptide einer Probe.

Der unterschiedliche Anteil an glutarylierter GDH wurde nun in Relation zur GDH-Enzymaktivität gesetzt. Kglu-spezifische Westernblots zeigten, dass der Glutarylierungsgrad von GDH *in vitro* sowohl mit steigender Glutaryl-CoA-Konzentration (Abb. 4.6 A/C) als auch längerer Inkubationszeit (Abb. 4.6 A/B) ansteigt.

Dieses Ergebnis bestätigten die Befunde der massenspektrometrischen Analyse der Proben. Hierfür wurden die Proben massenspektrometrisch untersucht und die Peakbereiche aller glutarylierten Peptide einer Probe, die durch Ionenchromatographie aufgereinigt worden waren, addiert und aufgetragen (Abb. 4.6 B/C).

*In vitro* konnten 17 glutarylierte Lysinreste identifiziert werden, von denen 7 auch *in vivo* modifiziert wurden (Anhang Abb. 8.1). Fast alle diese Reste wurden *in vitro* unabhängig von Inkubationszeit oder Glutaryl-CoA-Konzentration modifiziert. Dies lässt darauf schließen, dass bei steigender Konzentration bzw. verlängerter Inkubationszeit nicht mehr Lysinreste, sondern mehr Moleküle glutaryliert werden.

Anschließend wurde die Enzymaktivität der GDH gemessen. Bei der Umsetzung von Glutamat zu  $\alpha$ -Ketoglutarat durch GDH kommt es zur stöchiometrischen NADH-Freisetzung, die photometrisch nach Angaben des Herstellers gemessen und über eine NADH-Standardkurve (Abb. 4.7) quantifiziert wurde.

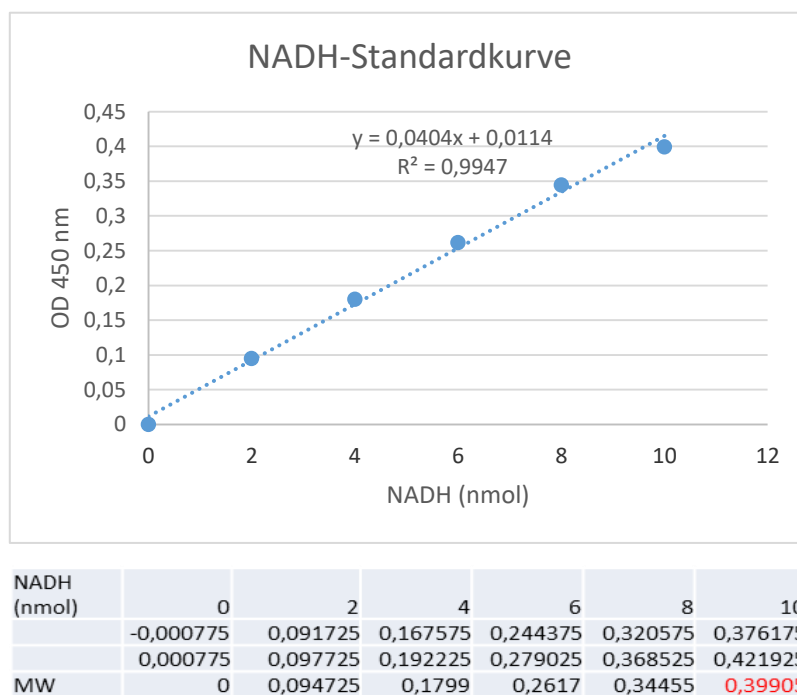
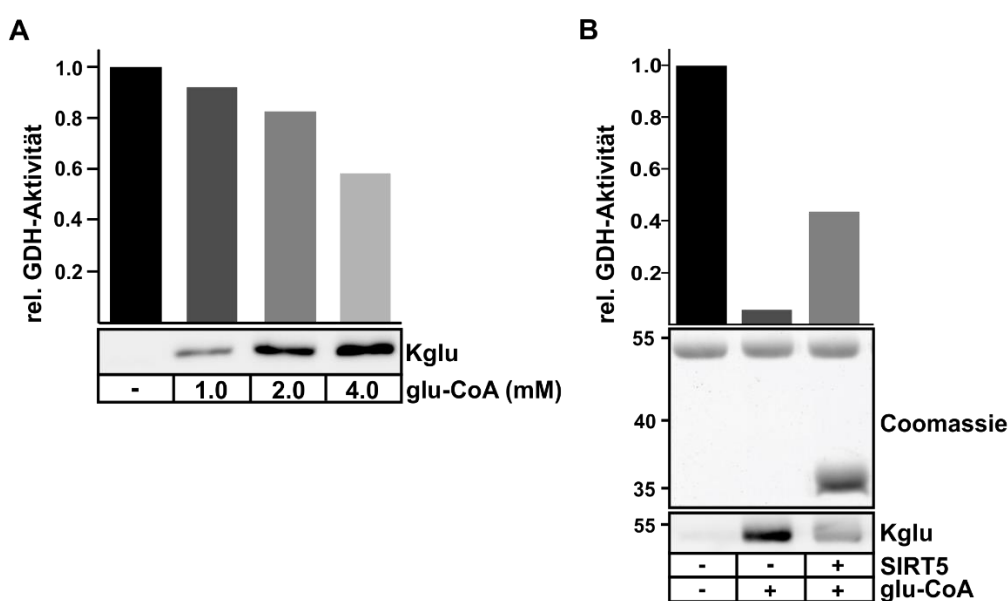


Abb. 4.7: GDH-Enzymaktivitätsmessung: NADH-Standardkurve.



Die Inkubationszeit variierte zwischen 3 min und der Zeit bis zum Erreichen des 10 nmol-NADH-Standardwertes.

Zur funktionellen Charakterisierung des Einflusses der Glutarylierung auf die GDH-Aktivität wurde GDH aus Rinderleber *in vitro* mit ansteigenden Glutaryl-CoA-Konzentrationen für 4 Stunden inkubiert. Abbildung 4.8 A zeigt, dass mit ansteigender Glutaryl-CoA-Konzentration die Kglu-Immunoreaktivität ansteigt und umgekehrt proportional die GDH-Aktivität auf 60% der nicht-modifizierten GDH sinkt. Die glutarylierungsabhängige Inhibition der GDH-Aktivität ist durch nachfolgende Inkubation mit aktiviertem SIRT5 partiell umkehrbar (Abb. 4.8 B).



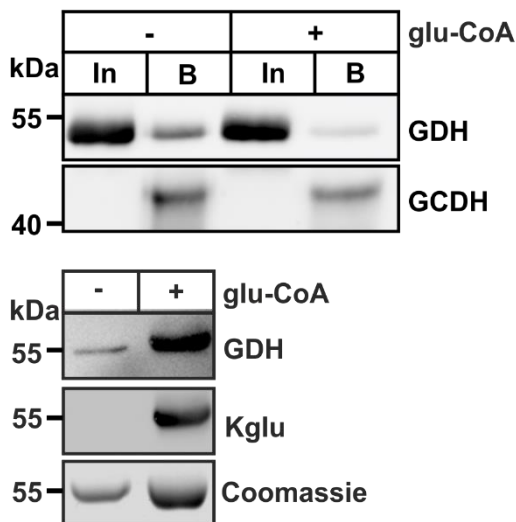
**Abb. 4.8: Der *in vitro* Glutarylierungsgrad inhibiert die GDH-Aktivität.**

- A) Relative Enzymaktivität von aufgereinigter boviner GDH nach 4-stündiger Inkubation ohne oder mit 1, 2 und 4 mM Glutaryl-CoA. Der Glutarylierungsgrad wurde durch Anti-Kglu-Westernblot bestimmt und zur Enzymaktivität nicht-glutarylierter GDH in Relation gesetzt.
- B) Relative Aktivität von GDH ohne (-) oder nach (+) *in vitro* Glutarylierung oder mit anschließender Inkubation mit aktiviertem SIRT5. Die Proteinglutarylierung wurde mittels Kglu-Westernblot nachgewiesen und auf die Coomassie-Brillant-Blau anfärbbare GDH-Bande quantifiziert.

#### 4.5 Effekt der Glutarylierung auf Proteininteraktionen

Als weiterer wichtiger funktioneller Aspekt wurde untersucht, ob und inwieweit die Glutarylierung die Interaktionen der GDH mit anderen Proteinen beeinflusst. Es wurde bereits gezeigt, dass GDH, das Elektronen-Transfer Flavoprotein Untereinheit B (ETFB) und die Dihydrolipoamid-S-Succinyltransferase (DLST) direkt mit GCDH interagieren (Schmiesing et al. 2014). Um den Einfluss der Glutarylierung auf die GDH-GCDH-

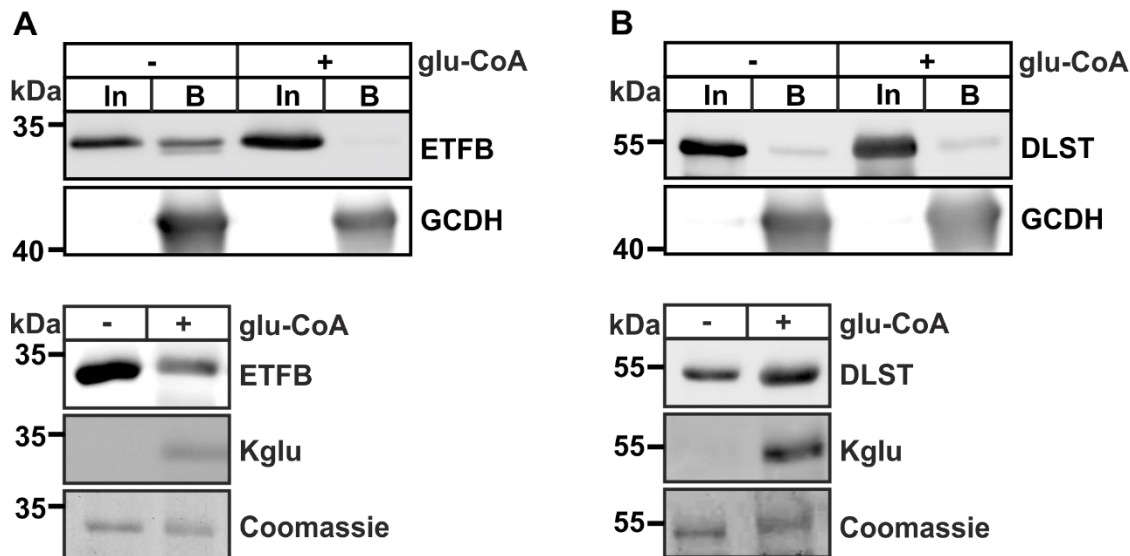
Interaktion zu untersuchen, wurde aufgereinigte GCDH an Affi-Gel-Beads gekoppelt und eine anschließende Affinitätschromatographie mit *in vitro* glutarylierter (+) bzw. nicht glutarylierter (-) GDH durchgeführt. Die an GCDH gebundene GDH (gebundene Fraktion, B) wurde abgelöst, durch Westernblot detektiert und in Bezug zur Ausgangsmenge (Input, In) gesetzt. Das Ergebnis zeigte, dass glutarylierte GDH kaum mit GCDH in Interaktion tritt (Abb. 4.9).



**Abb. 4.9: Die GDH-Glutarylierung verhindert die Interaktion mit GCDH.**

Oben: Aufgereinigte humane GCDH wurde kovalent an eine Affi-Gel-10-Matrix gebunden und mit nicht-glutarylierter (-) oder *in vitro* glutarylierter (+) GDH inkubiert. Aliquots des Inputs (In) und der gebundenen Fraktion (B) wurden durch GDH- und GCDH-Westernblot analysiert. Unten: Darstellung der *in vitro*-GDH-Glutarylierung mittels GDH- und Kglu-Westernblot, bezogen auf Coomassie-Brillant-Blau angefärbte GDH.

Als Kontrollen wurden analog zur GDH die Interaktion von GCDH mit aufgereinigtem und *in vitro* glutarylierten ETFB und DLST untersucht. Während die Glutarylierung von ETFB ebenfalls die Bindung an GCDH komplett verhinderte (Abb. 4.10 A), blieb die relativ schwache GCDH-Interaktion mit Glutaryl-DLST unbeeinträchtigt (Abb. 4.10 B).



**Abb. 4.10: Auswirkungen der Glutarylierung von ETFB und DLST auf die Interaktion mit GCDH.**

- A) *In vitro* glutaryliertes ETFB (+ glu-CoA) bindet nicht an GCDH. In, Input; B, gebundene Fraktion. Darunter: ETFB- und Kglu-Westernblot und Coomassie-Brillant-Blau-Färbung.
- B) Die Bindung von *in vitro* glutarylierter DLST (+ glu-CoA) an GCDH ist im Vergleich zur unglutarylierten DLST unverändert. Darunter: DLST- und Kglu-Westerblot und Coomassie-Brillant-Blau-Färbung.

Zusammenfassend zeigen die hier dargestellten Experimente, dass GDH an multiplen Lysinresten glutaryliert werden kann, jedoch in geringer Stöchiometrie. Die *in vitro* Glutarylierung hemmt partiell die enzymatische Aktivität der GDH, was durch Inkubation mit Sirtuin 5 umkehrbar ist. Die Glutarylierung der GDH hemmt jedoch die Interaktion mit GCDH und weist auf eine neue Ebene der Feinregulation der mitochondrialen Homöostase des Aminosäureabbaus bzw. der Energiegewinnung hin.

## 5. Diskussion

Die genauen Pathomechanismen bei der GA1 und hier insbesondere die Frage nach den Mechanismen, die zum selektiven Untergang striataler Neurone führen, sind bisher nicht ausreichend geklärt. Die bisherigen Hypothesen zur Pathogenese der GA1 sind nicht zufriedenstellend, weil sie auf Daten basieren, die aus heutiger Sicht unter experimentell sehr begrenzten Bedingungen oder unter Verwendung unzureichender Modellsysteme erhoben wurden. Außerdem können nur einzelne Symptome oder phänotypische Veränderungen erklärt werden. Die Entdeckung der Lysin-Glutarylierung von Proteinen und deren verstärktes Auftreten im GA1-Mausmodell eröffnete ein neues Forschungsfeld auf der Suche nach Erklärungen für Pathomechanismen der Glutarazidurie Typ 1.

### 5.1 Gewebespezifische und Glutaryl-CoA-konzentrationsabhängige Glutarylierung von Proteinen

Kürzlich berichteten Wagner *et al.* (2017), dass diverse Acyl-CoA-Spezies – darunter Glutaryl-CoA – auf nicht-enzymatische Weise Lysinreste von Proteinen modifizieren können. Voraussetzung ist eine genügend hohe Konzentration des Substrats Glutaryl-CoA und eine limitierte Zahl von Proteinen, die modifiziert werden können. Letzteres wird durch die subzelluläre Kompartimentierung stoffwechselaktiver Organellen gewährleistet. Da Glutaryl-CoA transient nur im Aminosäureabbauweg in der Matrix von Mitochondrien gebildet wird, sind auch nur glutarylierte mitochondriale Matrixproteine oder integrale Proteine der inneren Mitochondrienmembran zu erwarten. Diese Vermutung wurde eindeutig durch Immunogold-Elektronenmikroskopie (siehe 5.2 und Schmiesing *et al.* 2018) und die Lysin-Glutaryl-Proteome (Anhang Tab. 8.1) bestätigt. Ob und wie eventuell das geladene Dicarboxylat Glutaryl-CoA über die innere Mitochondrienmembran transloziert werden kann, ist unbekannt. Da das Ausmaß der nicht-enzymatischen Glutarylierung von der Glutaryl-CoA-Konzentration abhängig ist, korreliert die hier in dieser Arbeit beschriebene Intensität und die hohe Zahl glutarylierter Proteine in Mitochondrienextrakten aus Leber- und Nierengewebe von *Gcdh*-KO-Mäusen mit der Bedeutung und hohen Umsatzrate im Aminosäurestoffwechsel in diesen Organen. Umgekehrt gibt die fehlende bzw. geringe Proteinglutarylierung in Milz und Hirn der *Gcdh*-KO-Mäuse Hinweise auf die geringe Bedeutung des Abbaus von Lysin, Tryptophan und Hydroxylysin für die Homöostase dieser Organe (Abb. 4.1). Diese Schlussfolgerungen erfordern die

massenspektrometrische Bestimmung der absoluten Glutaryl-CoA-Konzentration in aufgereinigten Mitochondrienfraktionen aus den vier hier untersuchten Geweben. In der vom Sabatini-Labor kürzlich beschriebenen mitochondrialen Metabolom-Analyse (MITO-bolome) in HeLa-Zellen wurde jedoch darauf hingewiesen, dass die Isolierung der Mitochondrien innerhalb von 3,5 min und in Abwesenheit hoher Saccharose-Lösungen erfolgen muss, wie sie üblicherweise für die Mitochondrienpräparation verwendet werden, da es sonst zu signifikanten Veränderungen der Metabolit-Konzentrationen kommt (Chen et al. 2016).

Die durch Hochproteindiät (HPD) induzierte Krise bei *Gcdh*-KO-Mäusen ist mit einer Erhöhung der GA und 3OHGA Konzentrationen im Hirn und Serum verbunden (Keyser et al. 2008). Erstaunlicherweise bleiben die Glutarylierungsmuster und -intensitäten in Leber-, Hirn- und Nierenextrakten von *Gcdh*-KO-Mäusen unverändert (Abb.4.4). Vermutlich werden selbst unter HPD-induzierten katabolen Bedingungen die mitochondrialen Konzentrationen von Glutaryl-CoA in den untersuchten Organen eng reguliert und überschüssiges Glutaryl-CoA direkt in GA und 3OHGA umgewandelt.

Eine weitere Ebene der Regulation von Proteinglutarylierungen unter ND- und HPD-Bedingungen stellt die Aktivität bzw. Konzentration von SIRT5 dar, das durch Deglutarylierung die Intensitäten und die Zahl modifizierter Proteine konstant hält. Danach wären unter HPD-Bedingungen höhere Spiegel an SIRT5 zu erwarten gewesen, die allerdings durch SIRT5-Westernblots nicht bestätigt wurden (Abb. 4.4). Allerdings können allosterische Regulationsmechanismen der SIRT5-Aktivität, z. B. durch veränderte NAD-Konzentrationen unter HPD, nicht ausgeschlossen werden.

Auch im Serum sind bei GA1 Patienten erhöhte Konzentrationen von GA und 3OHGA und ihrer Carnitin-Derivate nachweisbar, die mit einer vermehrten Ausscheidung über den Urin assoziiert sind. Die Elimination der toxischen Metaboliten wird durch den Na<sup>+</sup>-abhängigen Dicarboxylat-Cotransporter Typ 3 (NaC3) und Organische-Anionen-Transporter 1 und 4 (OAT1/OAT4) erleichtert (Hagos et al. 2008, Stellmer et al. 2007). Da physiologischer Weise weniger als 150 mg Protein in 24 Stunden über den Urin ausgeschieden werden (hierunter größtenteils Albumin und Antikörper-Leichtketten), verwundert es nicht, dass keine glutarylierten Proteine im Urin von *Gcdh*-KO-Mäusen nachgewiesen wurden. Auch im Serum konnten keine glutarylierten Proteine nachgewiesen werden (Abb. 4.2). Diese Daten zeigen, dass glutarylierte Proteine, selbst wenn sie aus den Mitochondrien in das

Zytoplasma transloziert werden, nicht die Plasmamembran überwinden bzw. sezerniert werden können.

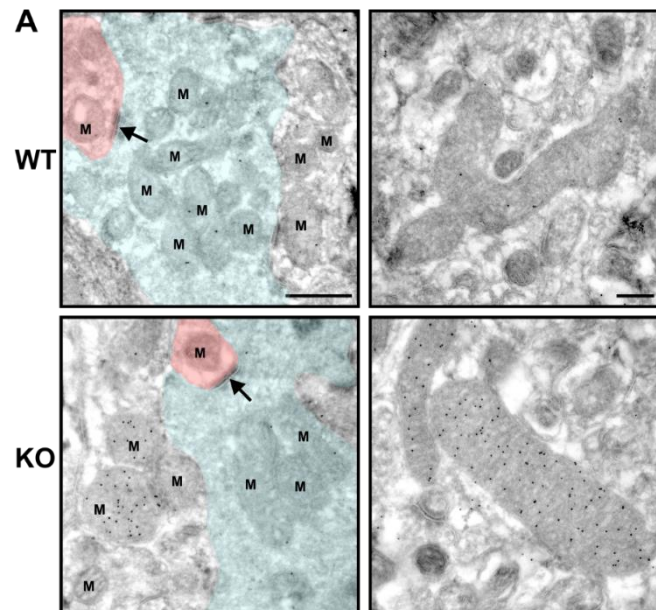
## 5.2 Cerebrale Lysin-Glutarylierung erfolgt ausschließlich in Gliazellen

Die in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse werfen ein neues Licht auf die Pathogenese der GA1. Insgesamt wurden 37 glutarylierte Proteine im Hirn von *Gcdh*-KO-Mäusen identifiziert. Die Mehrheit dieser Enzyme ist am Abbau der Aminosäuren Valin, Leucin, Lysin und Tryptophan sowie der Kohlenstoff-Assimilation beteiligt. Außerdem weist jedes Enzym des TCA-Zyklus - zumindest in der Leber - wenigstens einen glutarylierten Lysinrest auf (Anhang Tab.8.1). Das Enzym mit den meisten glutarylierten Lysinresten im Hirn ist die 55 kDa Glutamat-Dehydrogenase (GDH; Anhang Tab. 8.1).

GDH katalysiert die reversible oxidative Desaminierung von Glutamat zu  $\alpha$ -Ketoglutarat, hierbei entstehen NADH und Ammonium-Ionen. Neben ihrer zentralen Bedeutung für den Stickstoffmetabolismus und der Aufrechterhaltung der Energiehomöostase, besonders in der Leber, spielt GDH eine wichtige Rolle im Glutamatstoffwechsel im Gehirn. Einerseits bei der Vermeidung von Exzitotoxizität und andererseits bei der Bereitstellung der Neurotransmitter Glutamat und GABA. In den von Frau Dr. Michaela Schweizer (Zentrum für Molekulare Neurobiologie Hamburg) durchgeführten Analysen zur Lokalisation glutarylierter Proteine im Cerebellum *Gcdh*-defizienter Mäuse, ließen sich immunhistochemisch und durch Immunogold-Elektronenmikroskopie glutarylierte Proteine ausschließlich in den Mitochondrien nachweisen, aber überraschenderweise weder in den Perikarya oder Axonterminalen der Neurone, sondern ausnahmslos nur in den Mitochondrien von Gliazellen (Abb. 5.1).

Dieses Ergebnis stimmt mit der vorwiegenden Lokalisation von GDH in Astrozyten und Bergmann-Glia-Zellen überein und korreliert zudem mit der Endstrecke der glutamatergen Neurotransmission und Expression der Glutamat-Transporter GLT1 und GLAST (Regan et al. 2007). Diese beiden Transporter sind für die (Wieder-) Aufnahme des in den synaptischen Spalt freigesetzten Glutamats zuständig, um eine Überaktivierung von Glutamat-Rezeptoren zu vermeiden. In den Astrozyten kann Glutamat daraufhin in Glutamin umgewandelt und über den Glutamin-Shuttle zu Neuronen transportiert werden, wo es als Grundbaustein für die erneute Synthese von Glutamat zur Verfügung steht, oder es wird oxidativ zu  $\alpha$ -

Ketoglutarat desaminiert und in den TCA-Zyklus eingeschleust bzw. dient der anaplerotischen Substituierung von benachbarten Neuronen.



**Abb. 5.1: Lokalisation glutarylierter Proteine in Mitochondrien von Gliazellen.**

Anti-Kglu-Immungoldfärbung an cerebellären Kryoschnitten von WT- und *Gcdh*-KO-Mäusen. Der synaptische Spalt ist je mit Pfeilen gekennzeichnet. Rot hinterlegt: Dendrit. Blau hinterlegt: präsynaptische Endigung. Mitochondrien sind mit M markiert. Skalierungsbalken: 500 nm (linkes Bild), 250 nm (rechtes Bild). Aus Schmiesing et al. 2018.

Die durch die vorliegenden Befunde nachgewiesene reduzierte Enzymaktivität glutarylierter GDH wirkt sich möglicherweise vielfältig auf den Gesamtstoffwechsel von *Gcdh*-KO-Mäusen aus. Im Hirn könnten erhöhte Glutamatspiegel zur Exzitotoxizität beitragen bzw. den Neurotransmitterhaushalt aus dem Gleichgewicht bringen (Plaitakis et al. 2017). Die verminderte GDH-Aktivität könnte weiterhin zu einer verminderten Bereitstellung von TCA-Zyklus-Intermediaten ( $\alpha$ -Ketoglutarat, Succinat) führen, die sekundär deren anaplerotischen Transfer zu Neuronen und die ATP-Bereitstellung gefährdet (Lamp et al. 2011). Außerdem könnte die Aktivität der GDH durch weitere PTMs zusätzlich herabgesetzt werden, da ebenfalls eine Acetylierung (Rardin et al. 2013) sowie Succinylierung und Malonylierung (Du et al. 2011) der GDH beschrieben wurde.

Es ist jedoch zu bemerken, dass obwohl die Enzymaktivität der *in vitro* glutarylierten GDH stark reduziert war, keine Veränderungen der GDH-Aktivität in mitochondrialen Fraktionen aus *Gcdh*-KO-Hirnen festgestellt wurden (Schmiesing et al., 2018). Das ist höchst wahrscheinlich auf die niedrige Stöchiometrie der GDH-Glutarylierung und die geringe Zahl von Mitochondrien zurückzuführen (10% aller gliären Mitochondrien; Schmiesing et al.

2018), die glutarylierte Proteine enthalten und damit den Nachweis erniedrigter GDH-Aktivität in Hirnextrakten verhindern.

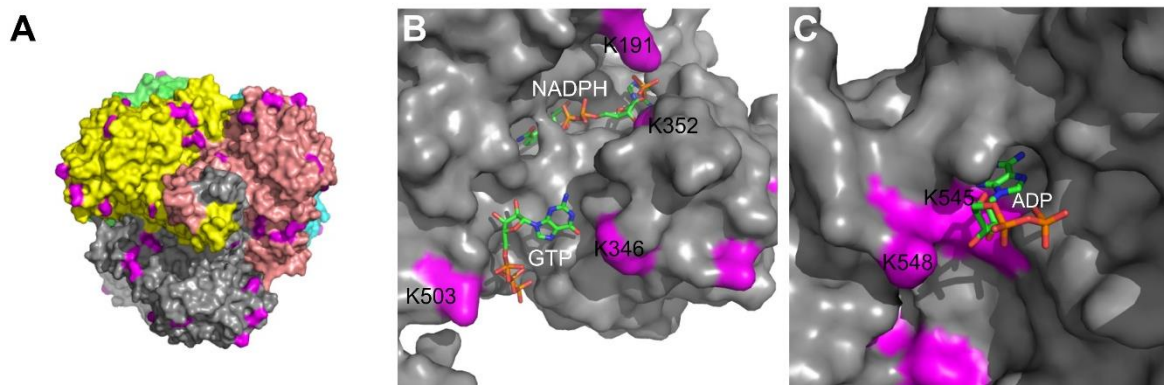
### **5.3 Glutarylierung hemmt Effektor-Bindung und Protein-Protein-Interaktionen der GDH**

GDH stellt einen homohexameren Komplex dar, der von multiplen allosterischen Effektoren in seiner Aktivität reguliert wird. GTP beispielsweise ist ein negativer Effektor, während ADP und L-Leucin die GDH-Aktivität positiv beeinflussen (Plaitakis et al. 2017).

Prof. Dr. Henning Tidow (Institut für Biochemie und Molekularbiologie der Universität Hamburg) entwarf ein dreidimensionales, auf Homologien basiertes Maus-Gdh-Modell, das einen Einblick in die räumliche Umgebung der glutarylierten Lysinreste *in silico* erlaubt. Das Modell weist sowohl alle *in vivo* identifizierten als auch in boviner GDH *in vitro* glutarylierten Lysinreste auf (Anhang Abb. 8.1). Die genaue Analyse des Gdh-Hexamer-3D-Modells deutete darauf hin, dass *in vitro/in vivo* glutarylierte Lysinreste weniger an den Kontaktflächen der einzelnen Gdh-Monomer-Untereinheiten liegen als vielmehr an der freiliegenden Oberfläche des Proteins. Das bedeutet, dass die Glutarylierung weder die Interaktionen der Monomere noch die Stabilität des Gdh-Proteins signifikant reduziert. Die Lysin-Glutarylierungen beeinträchtigen aber v. a. die Bindung der Substrate und allosterischen Effektoren an die GDH. Die beteiligten Lysin-Seitenketten der GDH stehen größtenteils über Salzbrücken mit den Phosphatgruppen der Substrate und allosterischen Effektoren in Verbindung, wobei die negative Ladung des Glutarylrestes möglicherweise die Bildung der  $\text{NH}_4^+$  -  $\text{PO}_4^-$  -Brücken verhindert und dadurch die Interaktionen mit anderen Proteinen beeinflusst. So zeigte das 3D-Modell, dass die *in vivo* glutarylierten Reste K191 und K352 nahe der NADPH-Bindungsstelle lokalisiert sind (Abb. 5.2 A), K503 und K346 die GTP-Bindungsstelle umgeben (Abb. 5.2 B) und K545 und K548 Teil der ADP-Effektor-Bindungsstelle sind (Abb. 5.2 C, Schmiesing et al. 2018).

Die durchgeführten Versuche und *in-silico*-Modellierungen legen nahe, dass Lysin-Glutarylierungen nicht nur die Aktivität von Enzymen durch verminderte Bindung von Substraten und allosterischen Effektoren inhibieren, sondern auch durch den Verlust der Fähigkeit zur Wechselwirkung mit anderen (regulatorischen) Proteinen.





**Abb. 5.2: *In-silico*-3D-Modell des glutarylierten murinen Gdh-Proteins.**

- A) Oberflächendarstellung des murinen Gdh (pdb:3etd) mittels eines Homologiemodells. Verschiedene Farben repräsentieren die einzelnen Untereinheiten des Hexamers; die als glutaryliert identifizierte Lysinreste sind lila markiert.
- B) Vergrößerte Darstellung der potentiellen Lysinreste als Glutaryl-Bindungsstellen. Gebundenes GTP und NADPH sind im Stäbchen-(Gitter-)modell dargestellt, wobei die Farben entsprechende Atome darstellen.
- C) Strukturelle Betrachtung der modifizierten Lysinreste 545 und 548 nahe der ADP-Bindungsstelle. ADP ist als farbkodiertes Stäbchenmodell dargestellt. Aus Schmiesing et al. 2018.

So sind sowohl die Interaktionen der glutarylierten GDH als auch des ETFB mit der mitochondrialen GCDH stark beeinträchtigt. Das Elektronen-Transfer Flavoprotein (ETF) bildet ein aus ETF- $\alpha$  (ETF $\alpha$ ) und ETF- $\beta$  (ETF $\beta$ ) bestehendes Heterodimer. Durch kovalent gebundenes FAD dient es als Elektronentransporter für mindestens 9 mitochondriale Matrix-Flavoprotein-Dehydrogenasen, darunter auch GCDH. ETF nimmt 2 Elektronen auf und transportiert diese zur Atmungskette indem es sie an die membrangebundenen ETF-Ubiquinon-Oxidoreduktase abgibt (Toogood et al. 2007). Die Beeinträchtigung der Interaktion der ETF- $\beta$ -Untereinheit mit GCDH könnte sekundär zu einer zusätzlichen Beeinträchtigung der Energiebereitstellung durch mehrstufige Funktionsbeeinflussung eines größeren GCDH-Multienzym-Komplexes (Schmiesing et al. 2014) führen.

In Übereinstimmung mit den vorliegenden Daten und Schlussfolgerungen wurde berichtet, dass die GDH selbst auch Teil supramolekularer Strukturen ist. Hierzu gehört die Komplexbildung mit Enzymen, die am Abbau verzweigtkettiger Aminosäuren beteiligt sind, wie dem  $\alpha$ -Ketoglutarat-Dehydrogenase-Komplex, der Aspartat-Aminotransferase oder GCDH (Hutson et al. 2011, Schmiesing et al. 2014, Zhang et al. 2006). Höchstwahrscheinlich beeinträchtigt die Glutarylierung der GDH auch die Bildung dieser „Metabolons“ und somit die metabolische Homöostase.

## 5.4 Spielen Proteinglutarylierungen eine Rolle in der Pathogenese der GA1?

Die Inhibition der katalytischen Aktivität sowie der Verlust der allosterischen Regulation der GDH-Aktivität und der Interaktionen mit spezifischen Proteinen durch nicht-enzymatische Glutarylierung sind besonders relevant für die Kommunikation zwischen Neuronen, für den anaplerotischen Austausch von TCA-Zyklus-Intermediaten zwischen Gliazellen und Neuronen, und damit für die Energiebereitstellung bzw. Degeneration von Neuronen. Somit könnte die Glutarylierung einen neuen Pathomechanismus für die Neurodegeneration infolge von katabolen Krisen bei GA1-Patienten darstellen. Neben der Reduktion der GDH-Aktivität sind bisher drei weitere Proteine beschrieben worden, deren Funktion durch Glutarylierung stark gestört sind: Carbamyl-Phosphat-Synthetase 1, Carboanhydrase 5B und Malatdehydrogenase 2 (Schmiesing et al. 2018, Tan et al. 2014, Wagner et al. 2017). Die funktionelle Relevanz aller glutarylierten mitochondrialen Proteine zusammen mit der Möglichkeit überlappender, inhibitorischer Acylmodifikationen, besonders von Aminosäure-abbauenden Enzymen und im TCA-Zyklus (Wagner et al. 2017), bei GA1 ist noch spekulativ und benötigt weitere Untersuchungen. Die geringe Zahl von Mitochondrien, die in den Astrozyten von *Gcdh*-KO-Mäusen glutarylierte Proteine enthalten, haben zu neuen allgemeinen Erkenntnissen zur Regulation mitochondrialer Stoffwechselwege geführt, die auf einer funktionellen Mikroheterogenität basieren (Schmiesing et al. 2018). Andererseits lässt sie Proteinglutarylierungen als alleiniges pathomechanistisches Prinzip bei GA1 unwahrscheinlich erscheinen. Eher sind es kombinatorische Effekte von Proteinglutarylierungen und erhöhte Konzentrationen der toxischen Metaboliten GA und 3OHGA, die eine begrenzte Zerstörung von striatalen Neuronen während enzephalopathischer Krisen bei GA1-Patienten verursachen könnten.

## 6. Zusammenfassung

Glutarazidurie Typ 1 (GA1) ist eine autosomal-rezessiv vererbte neurodegenerative Stoffwechselerkrankung. Die Defizienz der Glutaryl-CoA-Dehydrogenase (GCDH), die am Abbau der Aminosäuren Hydroxylysin, Lysin und Tryptophan beteiligt ist, führt zu einer Akkumulation der toxischen Metaboliten GA, 3OHGA und Glutaryl-CoA. Glutaryl-CoA ist an einer kürzlich neu beschriebenen posttranslationalen Modifikation von Proteinen, der Lysin-Glutarylierung, beteiligt. In den ersten Lebensmonaten können katabole Stoffwechsellagen bei GA1-Patienten enzephalopathische Krisen auslösen. Hierbei kommt es zur Degeneration striataler Neurone, was in einer dyston-dyskinetischen Bewegungsstörung mit variabler klinischer Ausprägung resultiert. Die zugrundeliegenden Pathomechanismen sind noch weitgehend unklar. Ziel dieser Arbeit war es, neben einer allgemeinen Analyse glutarylierter Proteine in Leber und Hirn von *Gcdh*-KO-Mäusen die Bedeutung der Glutarylierung für die Glutamat-Dehydrogenase (GDH) im Speziellen zu untersuchen und die Rolle der Protein-Glutarylierung für die Pathophysiologie der GA1 zu diskutieren.

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Ergebnisse gewonnen:

1. Es liegt eine gewebespezifische Ausprägung der Glutarylierung von Proteinen vor, die mit der GCDH-Expression und der organspezifischen Bedeutung des Lysin-, Tryptophan- und Hydroxylysin-Abbaus korreliert. Leber- und Nierengewebe von *Gcdh*-KO-Mäusen weisen deutlich stärkere Glutarylierungsmuster und -intensitäten auf als Hirn. Die Induktion einer metabolischen Krise im Tiermodell führt zu keinem weiteren Anstieg des Glutarylierungsgrades, was auf einen eng regulierten mitochondrialen Glutaryl-CoA-Spiegel und eine gesteigerte Generierung von zytotoxischen GA- und 3OHGA-Metaboliten hinweist.
2. Mittels massenspektrometrischer Analyse wurden 37 glutarylierte mitochondriale Proteine im Hirn und 154 in der Leber von 6 Wochen alten Mäusen identifiziert. Die Mehrheit dieser Proteine ist am Abbau der Aminosäuren Valin, Leucin, Lysin und Tryptophan, der Kohlenstoff-Assimilation und dem TCA-Zyklus beteiligt.
3. Die GDH ist mit 11 modifizierten Lysinresten das im *Gcdh*-KO-Maushirn am stärksten glutarylierte Protein. Die Enzymaktivität von *in vitro* glutarylierter GDH ist signifikant um bis zu 95% gegenüber nicht modifizierter GDH reduziert. Homologie-Modellierungen der Maus-GDH illustrieren, dass die glutarylierten Lysinreste K191 und

K352, K503 und K346 bzw. K545 und K548 nahe der allosterischen Effektor-Bindungsstellen für NADPH, GTP bzw. ADP lokalisiert sind.

4. Die Glutarylierung der GDH oder des Elektronen-Transfer Flavoproteins B (ETF<sub>B</sub>) inhibiert signifikant die Interaktion mit GCDH.
5. Die vorliegende Arbeit war Teil einer multidisziplinären Studie, in der auch durch Immunogold-Elektronenmikroskopie gezeigt wurde, dass im Hirn von *Gcdh*-KO-Mäusen die Glutarylierung von Proteinen nur für ca. 10% aller astrozytären Mitochondrien funktional relevant ist, während in Mitochondrien von neuronalen Zellen keine glutarylierten Proteine akkumulieren.

Zusammenfassend zeigt die Arbeit, dass verschiedene mitochondriale Proteine durch nicht-enzymatische Glutarylierung in ihrer Aktivität und Fähigkeit zur Protein-Protein-Interaktion gehemmt sind. Die Relevanz dieser Modifikationen an mitochondrialen Proteinen in gliären Zellen für die Degeneration striataler Neurone während enzephalopathischer Krisen bei GA1-Patienten ist noch unklar und bedarf weiterer Studien. Es ist wahrscheinlicher, dass kombinatorische und synergistisch negative Effekte von Proteinglutarylierungen und dem Anstieg toxischer GA- und 3OHGA-Metaboliten die pathomechanistische Grundlage für die striatale Neurodegeneration bei GA1 bilden.

## 7. Summary

Glutaric aciduria type 1 (GA1) is an inherited neurometabolic disorder. The deficiency of glutaryl-CoA dehydrogenase (GCDH), which plays a role in the degradation of the amino acids lysine, hydroxylysine and tryptophan, leads to accumulation of the toxic metabolites GA and 3OHGA and glutaryl-CoA. Glutaryl-CoA serves as a substrate for a recently identified posttranslational protein modification: lysine glutarylation. In the first months of life, GA1 patients are at risk to develop encephalopathic crises, which result in a selective irreversible destruction of striatal neurons with a subsequent dystonic/dyskinetic movement disorder of variable degree. As the mechanisms underlying the pathogenesis of GA1 are not fully understood, the aim of this study was to analyse the characteristics and effects of protein glutarylation and discuss its potential involvement in the pathophysiology of GA1.

The findings show that lysine glutarylation is tissue specific, corresponding to the GCDH expression and different importance of the degradation of lysine, hydroxylysine and tryptophan in the respective organ. The levels of glutarylation in liver and kidney of *Gcdh* KO mice are several fold higher than in brain. That the induction of metabolic crises in mouse model does not lead to an increase of the glutarylation level, suggests strictly regulated glutaryl-CoA levels and a subsequent higher generation of GA and 3OHGA.

Proteomic analysis identified 37 glutarylated mitochondrial proteins in brain and 154 in liver of *Gcdh* KO mice. Homology-based modeling of the in *Gcdh* KO brain most highly modified mouse glutamate dehydrogenase (Gdh, 11 glutarylated lysine residues) revealed that lysine residues identified to be glutarylated are located close to the binding sites of the allosteric effectors NADPH, GTP and ATP. Moreover, glutarylation blocks the protein-protein interactions between GDH or the electron transfer flavoprotein B (ETF<sub>B</sub>) and GCDH. The results show that glutarylation also impairs the catalytic activity of mitochondrial proteins, exemplified by *in vitro* glutarylated GDH, which activity was reduced by up to 95%.

This study was part of a multidisciplinary work, in which was also shown, via immunogold staining, that protein glutarylation is functionally relevant only for 10% of the mitochondria in astrocytes, whereas glutarylated proteins do not accumulate in neuronal mitochondria at all. Thus, the significance of these modifications in glial cells for the striatal neuronal degeneration requires further investigation. It is likely that the combination of negative protein glutarylation effects and the increase of toxic GA and 3OHGA are responsible for neuronal cell death during encephalopathic crises in GA1.

## 8. Literaturverzeichnis

Anderson KA, Green MF, Huynh FK, Wagner GR, Hirschey MD (2014) SnapShot: Mammalian Sirtuins, *Cell*. 159(4):956- e1.

Boy N, Mühlhausen C, Maier EM, Heringer J, Assmann B, Burgard P, Dixon M, Fleissner S, Greenberg CR, Harting I, Hoffmann GF, Karall D, Koeller DM, Krawinkel MB, Okun JG, Opladen T, Posset R, Sahm K, Zschocke J, Kolker S, Additional Individual C (2017) Proposed recommendations for diagnosing and managing individuals with glutaric aciduria type I: second revision, *J Inher Metab Dis*. 40(1):75-101.

Boy N, Mengler K, Thimm E, Schiergens KA, Marquardt T, Weinhold N, Marquardt I, Das AM, Freisinger P, Grunert SC, Vossbeck J, Steinfeld R, Baumgartner MR, Beblo S, Dieckmann A, Nake A, Lindner M, Heringer J, Hoffmann GF, Mühlhausen C, Maier EM, Ensenauer R, Garbade SF, Kölker S (2018) Newborn screening: A disease-changing intervention for glutaric aciduria type 1, *Ann Neurol*. 83(5):970-9.

Chen WW, Freinkman E, Wang T, Birsoy K, Sabatini DM (2016) Absolute Quantification of Matrix Metabolites Reveals the Dynamics of Mitochondrial Metabolism, *Cell*. 166(5):1324-37 e11.

Du J, Zhou Y, Su X, Yu JJ, Khan S, Jiang H, Kim J, Woo J, Kim JH, Choi BH, He B, Chen W, Zhang S, Cerione RA, Auwerx J, Hao Q, Lin H (2011) Sirt5 is a NAD-dependent protein lysine demalonylase and desuccinylase, *Science*. 334(6057):806-9.

Du Moulin M, Thies B, Blohm M, Oh J, Kemper MJ, Santer R, Mühlhausen C (2017) Glutaric Aciduria Type 1 and Acute Renal Failure: Case Report and Suggested Pathomechanisms, *JIMD Rep*.

Frezza C, Cipolat S, Scorrano L (2007) Organelle isolation: functional mitochondria from mouse liver, muscle and cultured fibroblasts, *Nat Protoc*. 2(2):287-95.

Goodman SI, Markey SP, Moe PG, Miles BS, Teng CC (1975) Glutaric aciduria; a "new" disorder of amino acid metabolism, *Biochem Med*. 12(1):12-21.

Goodman SI, Frerman FE (2001) Organic acidemias due to defects in lysine oxidation: 2-ketoadipic acidemia and glutaric acidemia. In: *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. Beaudet Al Scriver Cr, Sly Ws, Valle D, Childs B, Kinzler Kw, and Vogelstein B (Hrg.) 8, McGraw-Hill Inc., New York, USA, 2195-204.

Hagos Y, Krick W, Braulke T, Mühlhausen C, Burckhardt G, Burckhardt BC (2008) Organic anion transporters OAT1 and OAT4 mediate the high affinity transport of glutarate derivatives accumulating in patients with glutaric acidurias, *Pflugers Arch*. 457(1):223-31.

Hallen A, Jamie JF, Cooper AJ (2013) Lysine metabolism in mammalian brain: an update on the importance of recent discoveries, *Amino Acids*. 45(6):1249-72.

Harting I, Neumaier-Probst E, Seitz A, Maier EM, Assmann B, Baric I, Troncoso M, Mühlhausen C, Zschocke J, Boy NP, Hoffmann GF, Garbade SF, Kolker S (2009) Dynamic changes of striatal and extrastriatal abnormalities in glutaric aciduria type I, *Brain*. 132(Pt 7):1764-82.

Heringer J, Boy SP, Ensenaer R, Assmann B, Zschocke J, Harting I, Lucke T, Maier EM, Mühlhausen C, Haegi G, Hoffmann GF, Burgard P, Kolker S (2010) Use of guidelines improves the neurological outcome in glutaric aciduria type I, *Ann Neurol*. 68(5):743-52.

Hershberger KA, Abraham DM, Martin AS, Mao L, Liu J, Gu H, Locasale JW, Hirschey MD (2017) Sirtuin 5 is required for mouse survival in response to cardiac pressure overload, *J Biol Chem*. 292(48):19767-81.

Hershberger KA, Abraham DM, Liu J, Locasale JW, Grimsrud PA, Hirschey MD (2018) Ablation of Sirtuin5 in the postnatal mouse heart results in protein succinylation and normal survival in response to chronic pressure overload, *J Biol Chem*. 293(27):10630-45.

Hertz L (2004) Intercellular metabolic compartmentation in the brain: past, present and future, *Neurochem Int*. 45(2-3):285-96.

Hertz L, Peng L, Dienel GA (2007) Energy metabolism in astrocytes: high rate of oxidative metabolism and spatiotemporal dependence on glycolysis/glycogenolysis, *J Cereb Blood Flow Metab*. 27(2):219-49.

Hoffmann GF, Athanassopoulos S, Burlina AB, Duran M, De Klerk JB, Lehnert W, Leonard JV, Monavari AA, Müller E, Muntau AC, Naughten ER, Plecko-Starting B, Superti-Furga A, Zschocke J, Christensen E (1996) Clinical course, early diagnosis, treatment, and prevention of disease in glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency, *Neuropediatrics*. 27(3):115-23.

Hutson SM, Islam MM, Zaganas I (2011) Interaction between glutamate dehydrogenase (GDH) and L-leucine catabolic enzymes: intersecting metabolic pathways, *Neurochem Int*. 59(4):518-24.

Jafari P, Braissant O, Bonafe L, Ballhausen D (2011) The unsolved puzzle of neuropathogenesis in glutaric aciduria type I, *Mol Genet Metab*. 104(4):425-37.

Jiang H, Khan S, Wang Y, Charron G, He B, Sebastian C, Du J, Kim R, Ge E, Mostoslavsky R, Hang HC, Hao Q, Lin H (2013) SIRT6 regulates TNF-alpha secretion through hydrolysis of long-chain fatty acyl lysine, *Nature*. 496(7443):110-3.

Jitrapakdee S, Vidal-Puig A, Wallace JC (2006) Anaplerotic roles of pyruvate carboxylase in mammalian tissues, *Cell Mol Life Sci*. 63(7-8):843-54.

Keyser B, Glatzel M, Stellmer F, Kortmann B, Lukacs Z, Kölker S, Sauer SW, Muschol N, Herdering W, Thiem J, Goodman SI, Koeller DM, Ullrich K, Bräulke T, Mühlhausen C (2008) Transport and distribution of 3-hydroxyglutaric acid before and during induced encephalopathic crises in a mouse model of glutaric aciduria type 1, *Biochim Biophys Acta*. 1782(6):385-90.

Koeller DM, Woontner M, Crnic LS, Kleinschmidt-Demasters B, Stephens J, Hunt EL, Goodman SI (2002) Biochemical, pathologic and behavioral analysis of a mouse model of glutaric acidemia type I, *Hum Mol Genet.* 11(4):347-57.

Kölker S, Okun JG, Ahlemeyer B, Wyse AT, Horster F, Wajner M, Kohlmüller D, Mayatepek E, Krieglstein J, Hoffmann GF (2002) Chronic treatment with glutaric acid induces partial tolerance to excitotoxicity in neuronal cultures from chick embryo telencephalons, *J Neurosci Res.* 68(4):424-31.

Kölker S, Koeller DM, Okun JG, Hoffmann GF (2004a) Pathomechanisms of neurodegeneration in glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency, *Ann Neurol.* 55(1):7-12.

Kölker S, Koeller DM, Sauer S, Horster F, Schwab MA, Hoffmann GF, Ullrich K, Okun JG (2004b) Excitotoxicity and bioenergetics in glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency, *J Inherit Metab Dis.* 27(6):805-12.

Kölker S, Garbade SF, Greenberg CR, Leonard JV, Saudubray JM, Ribes A, Kalkanoglu HS, Lund AM, Merinero B, Wajner M, Troncoso M, Williams M, Walter JH, Campistol J, Marti-Herrero M, Caswill M, Burlina AB, Lagler F, Maier EM, Schwahn B, Tokatli A, Dursun A, Coskun T, Chalmers RA, Koeller DM, Zschocke J, Christensen E, Burgard P, Hoffmann GF (2006) Natural history, outcome, and treatment efficacy in children and adults with glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency, *Pediatr Res.* 59(6):840-7.

Kölker S, Valayannopoulos V, Burlina AB, Sykut-Cegielska J, Wijburg FA, Teles EL, Zeman J, Dionisi-Vici C, Baric I, Karall D, Arnoux JB, Avram P, Baumgartner MR, Blasco-Alonso J, Boy SP, Rasmussen MB, Burgard P, Chabrol B, Chakrapani A, Chapman K, Cortes ISE, Couce ML, De Meirleir L, Dobbelaere D, Furlan F, Gleich F, Gonzalez MJ, Gradowska W, Grunewald S, Honzik T, Horster F, Ioannou H, Jalan A, Haberle J, Haege G, Langereis E, De Lonlay P, Martinelli D, Matsumoto S, Mühlhausen C, Murphy E, De Baulny HO, Ortez C, Pedron CC, Pintos-Morell G, Pena-Quintana L, Ramadza DP, Rodrigues E, Scholl-Burgi S, Sokal E, Summar ML, Thompson N, Vara R, Pinera IV, Walter JH, Williams M, Lund AM, Garcia-Cazorla A (2015) The phenotypic spectrum of organic acidurias and urea cycle disorders. Part 2: the evolving clinical phenotype, *J Inherit Metab Dis.* 38(6):1059-74.

Kuban KC, Gilles FH (1985) Human telencephalic angiogenesis, *Ann Neurol.* 17(6):539-48.

Kulkarni SS, Canto C (2017) Mitochondrial Post-translational Modifications and Metabolic Control: Sirtuins and Beyond, *Curr Diabetes Rev.* 13(4):338-51.

Kupis W, Palyga J, Tomal E, Niewiadomska E (2016) The role of sirtuins in cellular homeostasis, *J Physiol Biochem.* 72(3):371-80.

Lamp J, Keyser B, Koeller DM, Ullrich K, Braulke T, Mühlhausen C (2011) Glutaric aciduria type 1 metabolites impair the succinate transport from astrocytic to neuronal cells, *J Biol Chem.* 286(20):17777-84.

Lamp J (2011) Biochemische Analyse und Proteinwechselwirkungen der Glutaryl-CoA-Dehydrogenase. Dissertation. Universität Hamburg.



Lindner M, Ho S, Fang-Hoffmann J, Hoffmann GF, Kölker S (2006) Neonatal screening for glutaric aciduria type I: strategies to proceed, *J Inherit Metab Dis.* 29(2-3):378-82.

Mühlhausen C, Burckhardt BC, Hagos Y, Burckhardt G, Keyser B, Lukacs Z, Ullrich K, Braulke T (2008) Membrane translocation of glutaric acid and its derivatives, *J Inherit Metab Dis.* 31(2):188-93.

Plaitakis A, Kalef-Ezra E, Kotzamani D, Zaganas I, Spanaki C (2017) The Glutamate Dehydrogenase Pathway and Its Roles in Cell and Tissue Biology in Health and Disease, *Biology (Basel).* 6(1):

Pode-Shakked B, Marek-Yagel D, Rubinshtein M, Pessach IM, Paret G, Volkov A, Anikster Y, Lotan D (2014) Glutaric Aciduria type I and acute renal failure - Coincidence or causality?, *Mol Genet Metab Rep.* 1(170-5).

Poge AP, Autschbach F, Korall H, Trefz FK, Mayatepek E (1997) Early clinical manifestation of glutaric aciduria type I and nephrotic syndrome during the first months of life, *Acta Paediatr.* 86(10):1144-7.

Posset R, Opp S, Struys EA, Volkl A, Mohr H, Hoffmann GF, Kolker S, Sauer SW, Okun JG (2015) Understanding cerebral L-lysine metabolism: the role of L-pipecolate metabolism in Gcdh-deficient mice as a model for glutaric aciduria type I, *J Inherit Metab Dis.* 38(2):265-72.

Rardin MJ, Newman JC, Held JM, Cusack MP, Sorensen DJ, Li B, Schilling B, Mooney SD, Kahn CR, Verdin E, Gibson BW (2013) Label-free quantitative proteomics of the lysine acetylome in mitochondria identifies substrates of SIRT3 in metabolic pathways, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 110(16):6601-6.

Regan MR, Huang YH, Kim YS, Dykes-Hoberg MI, Jin L, Watkins AM, Bergles DE, Rothstein JD (2007) Variations in promoter activity reveal a differential expression and physiology of glutamate transporters by glia in the developing and mature CNS, *J Neurosci.* 27(25):6607-19.

Sadhukhan S, Liu X, Ryu D, Nelson OD, Stupinski JA, Li Z, Chen W, Zhang S, Weiss RS, Locasale JW, Auwerx J, Lin H (2016) Metabolomics-assisted proteomics identifies succinylation and SIRT5 as important regulators of cardiac function, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 113(16):4320-5.

Sauer SW, Okun JG, Fricker G, Mahringer A, Müller I, Crnic LR, Muhlhausen C, Hoffmann GF, Horster F, Goodman SI, Harding CO, Koeller DM, Kölker S (2006) Intracerebral accumulation of glutaric and 3-hydroxyglutaric acids secondary to limited flux across the blood-brain barrier constitute a biochemical risk factor for neurodegeneration in glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency, *J Neurochem.* 97(3):899-910.

Schmiesing J, Schluter H, Ullrich K, Braulke T, Mühlhausen C (2014) Interaction of glutaric aciduria type 1-related glutaryl-CoA dehydrogenase with mitochondrial matrix proteins, *PLoS One.* 9(2):e87715.

Schmiesing J, Storch S, Dörfler AC, Schweizer M, Makrypidi-Fraune G, Thelen M, Sylvester M, Gieselmann V, Meyer-Schwesinger C, Koch-Nolte F, Tidow H, Mühlhausen C, Waheed A, Sly WS, Braulke T (2018) Disease-Linked Glutarylation Impairs Function and Interactions of Mitochondrial Proteins and Contributes to Mitochondrial Heterogeneity, *Cell Rep.* 24(11):2946-56.

Schousboe A, Westergaard N, Waagepetersen HS, Larsson OM, Bakken IJ, Sonnewald U (1997) Trafficking between glia and neurons of TCA cycle intermediates and related metabolites, *Glia.* 21(1):99-105.

Schousboe A, Scafidi S, Bak LK, Waagepetersen HS, Mckenna MC (2014) Glutamate metabolism in the brain focusing on astrocytes, *Adv Neurobiol.* 11(13-30).

Sebastian C, Satterstrom FK, Haigis MC, Mostoslavsky R (2012) From sirtuin biology to human diseases: an update, *J Biol Chem.* 287(51):42444-52.

Stellmer F, Keyser B, Burckhardt BC, Koepsell H, Streichert T, Glatzel M, Jabs S, Thiem J, Herdering W, Koeller DM, Goodman SI, Lukacs Z, Ullrich K, Burckhardt G, Braulke T, Mühlhausen C (2007) 3-Hydroxyglutaric acid is transported via the sodium-dependent dicarboxylate transporter NaDC3, *J Mol Med (Berl).* 85(7):763-70.

Strauss KA, Puffenberger EG, Robinson DL, Morton DH (2003) Type I glutaric aciduria, part 1: natural history of 77 patients, *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 121C(1):38-52.

Tan M, Peng C, Anderson KA, Chhoy P, Xie Z, Dai L, Park J, Chen Y, Huang H, Zhang Y, Ro J, Wagner GR, Green MF, Madsen AS, Schmiesing J, Peterson BS, Xu G, Ilkayeva OR, Muehlbauer MJ, Braulke T, Mühlhausen C, Backos DS, Olsen CA, Mcguire PJ, Pletcher SD, Lombard DB, Hirschey MD, Zhao Y (2014) Lysine glutarylation is a protein posttranslational modification regulated by SIRT5, *Cell Metab.* 19(4):605-17.

Thies B, Meyer-Schwesinger C, Lamp J, Schweizer M, Koeller DM, Ullrich K, Braulke T, Mühlhausen C (2013) Acute renal proximal tubule alterations during induced metabolic crises in a mouse model of glutaric aciduria type 1, *Biochim Biophys Acta.* 1832(10):1463-72.

Toogood HS, Leys D, Scrutton NS (2007) Dynamics driving function: new insights from electron transferring flavoproteins and partner complexes, *FEBS J.* 274(21):5481-504.

Ullrich K, Flott-Rahmel B, Schluff P, Musshoff U, Das A, Lucke T, Steinfeld R, Christensen E, Jakobs C, Ludolph A, Neu A, Roper R (1999) Glutaric aciduria type I: pathomechanisms of neurodegeneration, *J Inherit Metab Dis.* 22(4):392-403.

Van De Ven RaH, Santos D, Haigis MC (2017) Mitochondrial Sirtuins and Molecular Mechanisms of Aging, *Trends Mol Med.* 23(4):320-31.

Wagner GR, Bhatt DP, O'connell TM, Thompson JW, Dubois LG, Backos DS, Yang H, Mitchell GA, Ilkayeva OR, Stevens RD, Grimsrud PA, Hirschey MD (2017) A Class of Reactive Acyl-CoA Species Reveals the Non-enzymatic Origins of Protein Acylation, *Cell Metab.* 25(4):823-37 e8.

Westover JB, Goodman SI, Frerman FE (2001) Binding, hydration, and decarboxylation of the reaction intermediate glutacoyl-coenzyme A by human glutaryl-CoA dehydrogenase, *Biochemistry*. 40(46):14106-14.

Yodoya E, Wada M, Shimada A, Katsukawa H, Okada N, Yamamoto A, Ganapathy V, Fujita T (2006) Functional and molecular identification of sodium-coupled dicarboxylate transporters in rat primary cultured cerebrocortical astrocytes and neurons, *J Neurochem*. 97(1):162-73.

Zhang L, Cooper AJ, Krasnikov BF, Xu H, Bubber P, Pinto JT, Gibson GE, Hanigan MH (2006) Cisplatin-induced toxicity is associated with platinum deposition in mouse kidney mitochondria in vivo and with selective inactivation of the alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex in LLC-PK1 cells, *Biochemistry*. 45(29):8959-71.

Zinnanti WJ, Lazovic J, Wolpert EB, Antonetti DA, Smith MB, Connor JR, Woontner M, Goodman SI, Cheng KC (2006) A diet-induced mouse model for glutaric aciduria type I, *Brain*. 129(Pt 4):899-910.

## 9. Anhang

**Anhang Tab. 8.1: Proteomanalyse glutarylierter Substrate in *Gcdh*-KO-Maushirn und -leber (PRIDE-dataset identifiziert PXD007881).**

Grün: Gesamtzahl der Kglu-Bindungsstellen glutarylierter Proteine in hepatischen und cerebralen Mitochondrienextrakten der *Gcdh*-KO-Maus.

Rot: nicht-glutarylierte Proteine in hepatischen und cerebralen Mitochondrienextrakten der *Gcdh*-KO-Maus

Protein	Gen	Hirn	Leber
Glutamate dehydrogenase 1	<i>Glud1</i>	11	14
Aconitate hydratase	<i>Aco2</i>	6	5
Trifunctional enzyme subunit alpha	<i>Hadha</i>	5	7
Malate dehydrogenase	<i>Mdh2</i>	5	6
Citrate synthase	<i>Cs</i>	4	3
Trifunctional enzyme subunit beta	<i>Hadhb</i>	3	5
Isocitrate dehydrogenase [NADP]	<i>Idh2</i>	3	10
4-aminobutyrate aminotransferase	<i>Abat</i>	2	2
Short/branched chain specific acyl-CoA dehydrogenase	<i>Acadsb</i>	2	2
ATP synthase subunit beta	<i>Atp5b</i>	2	6
Succinyl-CoA:3-ketoacid coenzyme A transferase 1	<i>Oxct1</i>	2	
Protein NipSnap homolog 3B	<i>Nipsnap3b</i>	2	3
Succinate dehydrogenase flavoprotein subunit	<i>Sdha</i>	2	7
3-ketoacyl-CoA thiolase	<i>Acaa2</i>	1	14
Acyl-CoA dehydrogenase family member 10	<i>Acad10</i>	1	1
Long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase	<i>Acadl</i>	1	2
Medium-chain specific acyl-CoA dehydrogenase	<i>Acadm</i>	1	2
Acetyl-CoA acetyltransferase	<i>Acat1</i>	1	5
Acyl-coenzyme A thioesterase 13	<i>Acot13</i>	1	1
Acyl-CoA synthetase family member 2	<i>Acsf2</i>	1	1
GTP:AMP phosphotransferase AK3	<i>Ak3</i>	1	1
Alpha-aminoadipic semialdehyde dehydrogenase	<i>Aldh7a1</i>	1	1
ATP synthase subunit O	<i>Atp5o</i>	1	6
Carbonic anhydrase 5B	<i>Ca5b</i>	1	
ES1 protein homolog	<i>D10Jhu81e</i>	1	1
Dihydrolipoyl dehydrogenase	<i>Dld</i>	1	8
Delta(3,5)-Delta(2,4)-dienoyl-CoA isomerase	<i>Ech1</i>	1	1

Enoyl-CoA hydratase	<i>Echs1</i>	1	2
Enoyl-CoA delta isomerase 2	<i>Eci2</i>	1	1
Aspartate aminotransferase	<i>Got2</i>	1	12
Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit gamma1	<i>Idh3a</i>	1	
Malonyl-CoA-acyl carrier protein transacylase	<i>Mcat</i>	1	1
3-mercaptopyruvate sulfurtransferase	<i>Mpst</i>	1	1
NAD kinase 2	<i>Nadk2</i>	1	
Cysteine desulfurase	<i>Nfs1</i>	1	1
Presequence protease	<i>Pitrm1</i>	1	
Thiosulfate sulfurtransferase	<i>Tst</i>	1	3
Kynurenine/alpha-aminoadipate aminotransferase	<i>Aadat</i>		2
Alpha-aminoadipic semialdehyde synthase	<i>Aass</i>		2
Short-chain specific acyl-CoA dehydrogenase	<i>Acads</i>		3
Cytoplasmic aconitate hydratase	<i>Aco1</i>		1
Acyl-coenzyme A synthetase ACSM1	<i>Acsm1</i>		3
Acyl-coenzyme A synthetase ACSM3	<i>Acsm3</i>		1
Acyl-coenzyme A synthetase ACSM5	<i>Acsm5</i>		1
Alcohol dehydrogenase 1	<i>Adh1</i>		1
Agmatinase	<i>Agmat</i>		2
Serine--pyruvate aminotransferase	<i>Agxt</i>		2
Alanine--glyoxylate aminotransferase 2	<i>Agxt2</i>		1
Aldehyde dehydrogenase X	<i>Aldh1b1</i>		3
Cytosolic 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase	<i>Aldh1l1</i>		1
Delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase	<i>Aldh4a1</i>		7
Methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase	<i>Aldh6a1</i>		3
4-trimethylaminobutyraldehyde dehydrogenase	<i>Aldh9a1</i>		2
Alpha-methylacyl-CoA racemase	<i>Amacr</i>		1
NAD(P)H-hydrate epimerase	<i>Apo1bp</i>		1
Arginase-1	<i>Arg1</i>		1
ATPase family AAA domain-containing protein 3	<i>Atad3</i>		1
ATP synthase subunit alpha	<i>Atp5a1</i>		5
ATP synthase subunit gamma	<i>Atp5c1</i>		1
ATP synthase subunit delta	<i>Atp5d</i>		1
ATP synthase subunit epsilon	<i>ATP5E</i>		1

ATP synthase F(0) complex subunit B1	<i>Atp5f1</i>		4
ATP synthase subunit d	<i>Atp5h</i>		7
ATP synthase-coupling factor 6	<i>Atp5j</i>		1
ATP synthase subunit f	<i>Atp5j2</i>		1
ATP synthase subunit g	<i>Atp5l</i>		2
Methylglutaconyl-CoA hydratase	<i>Auh</i>		3
D-beta-hydroxybutyrate dehydrogenase	<i>Bdh1</i>		1
Valacyclovir hydrolase	<i>Bphl</i>		4
Carboxylesterase 1D	<i>Ces1d</i>		1
CDGSH iron-sulfur domain-containing protein 3	<i>Cisd3</i>		1
Ubiquinone biosynthesis O-methyltransferase	<i>Coq3</i>		1
Ubiquinone biosynthesis monooxygenase COQ6	<i>Coq6</i>		1
Cytochrome c oxidase subunit 4 isoform 1	<i>Cox4i1</i>		1
Cytochrome c oxidase subunit 5B	<i>Cox5b</i>		1
Carbamoyl-phosphate synthase	<i>Cps1</i>		36
Cytochrome c, somatic	<i>Cycs</i>		1
Sterol 26-hydroxylase	<i>Cyp27a1</i>		3
Lipoamide acyltransferase	<i>Dbt</i>		3
D-dopachrome decarboxylase	<i>Ddt</i>		3
2,4-dienoyl-CoA reductase	<i>Decr1</i>		3
Probable 2-oxoglutarate dehydrogenase E1 component	<i>Dhtkd1</i>		1
Dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase	<i>Dlat</i>		1
Dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase	<i>Dlst</i>		1
Dimethylglycine dehydrogenase	<i>Dmgdh</i>		8
Enoyl-CoA delta isomerase 1	<i>Eci1</i>		1
Elongation factor 1-alpha 1	<i>Eef1a1</i>		1
Peroxisomal bifunctional enzyme	<i>Ehhadh</i>		1
Electron transfer flavoprotein subunit alpha	<i>Etfa</i>		4
Electron transfer flavoprotein subunit beta	<i>Etfb</i>		2
Electron transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase	<i>Etfdh</i>		1
Persulfide dioxygenase ETHE1	<i>Ethel</i>		1
Ferrochelataase	<i>Fech</i>		2
Fumarate hydratase	<i>Fh</i>		4
2-amino-3-ketobutyrate coenzyme A ligase	<i>Gcat</i>		3

Glutamine synthetase	<i>Glul</i>		1
Glycine N-acyltransferase	<i>Glyat</i>		3
Glycine N-acyltransferase-like protein	<i>Gm4952</i>		3
Glutathione peroxidase 1	<i>Gpx1</i>		4
Glutathione S-transferase A3	<i>Gsta3</i>		1
Glutathione S-transferase kappa 1	<i>Gstk1</i>		4
Glutathione S-transferase P 1	<i>Gstp1</i>		1
Maleylacetoacetate isomerase	<i>Gstz1</i>		1
L-gulonolactone oxidase	<i>Gulo</i>		1
Hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase	<i>Hadh</i>		3
Hydroxyacylglutathione hydrolase	<i>Hagh</i>		1
Haloacid dehalogenase-like hydrolase domain-containing protein 3	<i>Hdhd3</i>		1
3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase	<i>Hibadh</i>		2
3-hydroxyisobutyryl-CoA hydrolase	<i>Hibch</i>		1
Histidine triad nucleotide-binding protein 2	<i>Hint2</i>		1
Hydroxymethylglutaryl-CoA lyase	<i>Hmgcl</i>		1
Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase	<i>Hmgcs2</i>		9
3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type-2	<i>Hsd17b10</i>		4
3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 5	<i>Hsd3b5</i>		2
Stress-70 protein	<i>Hspa9</i>		3
60 kDa heat shock protein	<i>Hspd1</i>		6
10 kDa heat shock protein	<i>Hspe1</i>		3
Putative transferase CAF17 homolog	<i>Iba57</i>		1
Isovaleryl-CoA dehydrogenase	<i>Ivd</i>		3
Glycine N-acyltransferase-like protein Keg1	<i>Keg1</i>		2
L-2-hydroxyglutarate dehydrogenase	<i>L2hgdh</i>		1
Acyl-protein thioesterase 1	<i>Lypla1</i>		1
Methylcrotonoyl-CoA carboxylase subunit alpha	<i>Mccc1</i>		1
Mitochondrial calcium uniporter regulator 1	<i>Mcur1</i>		1
Trans-2-enoyl-CoA reductase	<i>Mecr</i>		1
Methylmalonyl-CoA mutase	<i>Mut</i>		1
NADH dehydrogenase 1 alpha subcomplex subunit 5	<i>Ndufa5</i>		3
NADH dehydrogenase 1 alpha subcomplex subunit 6	<i>Ndufa6</i>		1

NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit	<i>Ndufs1</i>		3
Protein NipSnap homolog 1	<i>Nipsnap1</i>		4
Omega-amidase NIT2	<i>Nit2</i>		1
Ornithine carbamoyltransferase	<i>Otc</i>		5
3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase	<i>Oxsm</i>		1
Pyruvate carboxylase	<i>Pc</i>		3
Pterin-4-alpha-carbinolamine dehydratase 2	<i>Pcbd2</i>		1
Propionyl-CoA carboxylase alpha chain	<i>Pcca</i>		1
Peroxisomal trans-2-enoyl-CoA reductase	<i>Pecr</i>		1
Prohibitin	<i>Phb</i>		1
Inorganic pyrophosphatase 2	<i>Ppa2</i>		1
Peroxiredoxin-5	<i>Prdx5</i>		1
Proline synthase co-transcribed bacterial homolog protein	<i>Prosc</i>		1
60S ribosomal protein L11	<i>Rpl11</i>		1
Sarcosine dehydrogenase	<i>Sardh</i>		4
Calcium-binding mitochondrial carrier protein Aralar1	<i>Slc25a12</i>		2
Calcium-binding mitochondrial carrier protein Aralar2	<i>Slc25a13</i>		4
Mitochondrial glutamate carrier 1	<i>Slc25a22</i>		1
Phosphate carrier protein	<i>Slc25a3</i>		2
ADP/ATP translocase 2	<i>Slc25a5</i>		4
Superoxide dismutase [Mn]	<i>Sod2</i>		5
Succinyl-CoA ligase [ADP-forming] subunit beta	<i>Sucla2</i>		1
Succinyl-CoA ligase [ADP/GDP-forming] subunit alpha	<i>Suclg1</i>		3
Succinate--hydroxymethylglutarate CoA-transferase	<i>Sugct</i>		1
Mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim13	<i>Timm13</i>		1
Cytochrome b-c1 complex subunit 7	<i>Uqcrb</i>		4
Cytochrome b-c1 complex subunit 1	<i>Uqcrc1</i>		1
Cytochrome b-c1 complex subunit 2	<i>Uqcrc2</i>		1
Cytochrome b-c1 complex subunit 6	<i>Uqcrh</i>		1
Cytochrome b-c1 complex subunit 8	<i>Uqcrq</i>		1
Zinc-binding alcohol dehydrogenase domain-containing protein 2	<i>Zadh2</i>		1



## Anhang

human	MYRYLGEALLLSRAGPAALGSASADSAALLGWARGQPAAAPQPLGALAARRHYSEAVADR	60
mouse	MYRRLGEALLLSRAGPAALGSAAADSAALLGWARGQPSAAPQPLTPVARRHYSEAAADR	60
bovine	MYRYLGEALLLSRAGPAALGSASADSAALLGWARGQPAAAPQPLVPPARRHYSEAAADR	60
	*** :***** :***** . ***** .***	
human	EDDPNFFKMGVEGFFDRGASIVEDKLVEDLRTRESEEQKRNRRVIRGILRIIKPCNHVLSLSF	120
mouse	EDDPNFFKMGVEGFFDRGASIVEDKLVEDLKTRESEEQKRNRRVIRGILRIIKPCNHVLSLSF	120
bovine	EDDPNFFKMGVEGFFDRGASIVEDKLVEDLKTRETEEQKRNRRVRSILRIIKPCNHVLSLSF	120
	***** :*** :***** . *****	
human	PIRRDDGSWEVIEGYRAQHSQHRTPCGGIRYSTDVSVDEVKALASLMTYKCAVVDVDFG	180
mouse	PIRRDDGSWEVIEGYRAQHSQHRTPCGGIRYSTDVSVDEVKALASLMTYKCAVVDVDFG	180
bovine	PIRRDDGSWEVIEGYRAQHSQHRTPCGGIRYSTDVSVDEVKALASLMTYKCAVVDVDFG	180
	*****	
human	GAKAGVKINPKNYTDNELEKITRRFTMELAKKGFIPGIDVPAPDMSTGEREMSWIADTY	240
mouse	GAKAGVKINPKNYTDNELEKITRRFTMELAKKGFIPGIDVPAPDMSTGEREMSWIADTY	240
bovine	GAKAGVKINPKNYTDNELEKITRRFTMELAKKGFIPGVDVPAPDMSTGEREMSWIADTY	240
	***** :*****	
human	ASTIGHYDINAHACVTGKPISQGGIHGRISATGRGVFHGIENFINEASYMSILGMPGFG	300
mouse	ASTIGHYDINAHACVTGKPISQGGIHGRISATGRGVFHGIENFINEASYMSILGMPGFG	300
bovine	ASTIGHYDINAHACVTGKPISQGGIHGRISATGRGVFHGIENFINEASYMSILGMPGFG	300
	*****	
human	DKTFVVQGFNGVGLHSMRYLHRFGAKCIAVGESDGSIWNPDGIDPKELEDFKLQHGHSILG	360
mouse	DKTFVVQGFNGVGLHSMRYLHRFGAKCVGVGESDGSIWNPDGIDPKELEDFKLQHGHSILG	360
bovine	DKTFVVQGFNGVGLHSMRYLHRFGAKCITVGESDGSIWNPDGIDPKELEDFKLQHGHTILG	360
	***** :***** :***	
human	FPAKAPYEGSILEADCILIPAASEKQLTKSNAPRVKAKIIAEGANGPTTPEADKIFLER	420
mouse	FPAKAPYEGSILEADCILIPAASEKQLTKSNAPRVKAKIIAEGANGPTTPEADKIFLER	420
bovine	FPAKAPYEGSILEADCILIPAASEKQLTKSNAPRVKAKIIAEGANGPTTPEADKIFLER	420
	***** . *****	
human	NIMVIPDLYLNAGGVTVSYFEWLKLNHNHVSYGRLTFKYERDSNYHLLMSVQESLERKFGK	480
mouse	NIMVIPDLYLNAGGVTVSYFEWLKLNHNHVSYGRLTFKYERDSNYHLLMSVQESLERKFGK	480
bovine	NIMVIPDLYLNAGGVTVSYFEWLNHNHVSYGRLTFKYERDSNYHLLMSVQESLERKFGK	480
	***** :*****	
human	HGGTIPIVPTAEFQDRISGASEKDIVHSGLAYTMERSARQIMRTAMKYNLGLDLRRTAAYV	540
mouse	HGGTIPIVPTAEFQDRISGASEKDIVHSGLAYTMERSARQIMRTAMKYNLGLDLRRTAAYV	540
bovine	HGGTIPIVPTAEFQDRISGASEKDIVHSGLAYTMERSARQIMRTAMKYNLGLDLRRTAAYV	540
	***** :*****	
human	NAIEKVFVKVYNEAGVTFT	558
mouse	NAIEKVFVKVYNEAGVTFT	558
bovine	NAIEKVFVRVYNEAGVTFT	558
	***** :*****	

### Anhang Abb. 8.1: Konservierte glutarylierte Lysinreste der GDH.

Die Homologiesequenz wurde mittels ClustalW2 bestimmt. Durch MS-Analyse identifizierte glutarylierte Lysinreste werden in verschiedenen Farben dargestellt:

Türkis: identifizierte glutarylierte Lysinreste in *Gcdh*-KO-Leber- und Hirngewebe.

Grün: nur in *Gcdh*-KO-Leber identifizierte glutarylierte Lysinreste.

Gelb: identifizierte glutarylierte Lysinreste der *in vitro* modifizierten, aus Rinderleber isolierten GDH.

## 10. Publikation und Kongressbeitrag

### Publikation

Schmiesing J, Storch S, Dörfler A-C, Schweizer M, Makrypidi-Fraune G, Thelen M, Sylvester M, Gieselmann V, Meyer-Schwesinger C, Koch-Nolte F, Tidow H, Mühlhausen C, Waheed A, Sly WS, and Braulke T (2018): Disease-linked glutarylation impairs function and interactions of mitochondrial proteins and contributes to mitochondrial heterogeneity. *Cell Rep* 24:2946-2956

### Kongressbeitrag (Poster)

Schmiesing J, Dörfler A-C, Thelen M, Hirshey M, Mühlhausen C, Braulke T: Role of mitochondrial protein glutarylation in glutaric aciduria 1

Cell Symposia: Multifaceted Mitochondria, July 19-21 2015, Chicago

## 11. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich bei der Durchführung und Entstehung dieser Arbeit unterstützt haben.

Mein besonderer Dank geht an Thomas Braulke, Chris Mühlhausen und Jessica Schmiesing, die es mir ermöglicht haben, ein so spannendes Projekt zu bearbeiten und die mich durch anregende Diskussionen und konstruktive Kritik unterstützt und begleitet haben.

Bei Thomas Braulke möchte ich mich auch für die Leitung des Graduiertenkollegs 1459 bedanken, die dieses Projekt finanziell unterstützt und mir durch Retreats und Symposien wertvolle fachliche Weiterbildungsmöglichkeiten geboten hat. Eine besondere Erfahrung war das *Multifaceted Mitochondria Cell Symposium* in Chicago und ich möchte mich an dieser Stelle noch einmal ganz herzlich für diese Möglichkeit bedanken.

Danke auch an Melanie Thelen und Marc Sylvester für die MS-Analysen, an Michaela Schweizer für die EM-Bilder und Prof. Dr. Henning Tidow für das Gdh-3D-Modell.

Der ganzen Arbeitsgruppe danke ich für das tolle Arbeitsklima und die ausgeprägte Hilfsbereitschaft. Danke Johannes für deine Hilfe während des praktischen Teils und auch besonders am Ende der schriftlichen Arbeit! Ein großes Dankeschön an Sophia, Svenja, Saskia, Giorgia, Jane und Lisa-Marie für die vielen lustigen gemeinsamen Stunden. Ohne euch wäre das Jahr nicht dasselbe gewesen!

Lennart und Luki danke ich für ihre Hilfe und Unterstützung!

Und zuletzt danke ich meiner Familie, die immer zur Stelle ist, mich unterstützt und an mich glaubt! Besonderer Dank meinem Papa für seinen wundervollen Einsatz!

## **12. Lebenslauf**

Lebenslauf entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen.

## **13. Eidesstattliche Erklärung**

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: